



Karen Miranda Almeida

Bacharel em Engenharia de Alimentos

Desenvolvimento de Biofilmes à base de quitosano para a Indústria Alimentar

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz
Fernando, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Victor Gomes Lauriano de Souza, Bolseiro
de doutoramento, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, FCT/UNL
Vogal: Prof. Ana Luisa Almaça da Cruz Fernando

“Desenvolvimento de Biofilmes à base de quitosano para a Indústria Alimentar” © Karen Miranda Almeida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o qual me proporcionou a oportunidade de estudar nesta faculdade e me concedeu a honra de conhecer pessoas maravilhosas que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, por me dar forças estando tão longe de casa, nos momentos mais difíceis e por me ensinar a confiar nos seus propósitos em minha vida.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia, por me receber tão bem e pela oportunidade de realizar este curso, por todo apoio e compreensão. À professora Dra. Benilde Mendes, que foi meu primeiro contato aqui e me incentivou para vir realizar este mestrado; por cada professor que me passou conhecimento com toda dedicação no decorrer destes dois anos.

À minha professora e orientadora Dra. Ana Luísa Fernando, por toda a sua simpatia, paciência e por acreditar em mim, e ao Victor Souza por contribuir com seu tempo e dedicação e suportar minhas mensagens de SOS no WhatsApp, pessoas que me ajudaram a concluir esse trabalho com qualidade.

À associação de estudantes que me apresentou a Divisão de Eventos e Projectos Especiais (DEPE), que tem sido de grande ajuda para conciliar estudos e trabalho. A Dra Inês pelo seu carinho comigo. E por ganhar três maravilhosas mulheres como amigas, Dra. Ana Cristina Grobra, Anabela Seita e Andreia Machado, as quais tenho muito carinho e gratidão.

À Residência Fraústo da Silva, em que passei boa parte do tempo, pela compreensão da Dra. Clara, e a todos que me ajudaram muito em momentos complicados. À Sandra, aos simpáticos seguranças e em especial à Dona Linda, que me fez sentir em casa e me tratou como família.

Aos meus pais Maria Aparecida Miranda e Francisco das Chagas, que confiam e acreditam em mim, que me dão o amor e carinho que necessito mesmo longe e apoiam os meus sonhos, sendo difícil a distancia, e à minha amada e querida avó Raimunda por todo amor.

Aos meus irmãos, Ingrid Karinny e Lucas Miranda, os quais me estimularam na conclusão deste Mestrado e aos meus sobrinhos Felipe Almeida e Mateus Almeida uma das minhas alegrias todos os dias.

Às minhas amigas, em especial a Patrícia Aragão que veio comigo em busca de algo maior, que acreditou, que compartilha comigo os momentos de alegria e dificuldade, a amiga que me apoia, que me anima e me abraça nos momentos em que mais sinto saudades da minha família.

Agradeço ao Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa e aos meus colegas de curso que me ajudaram no laboratório, Sofia e João Pires. Pela atenção das auxiliares D. Rosa e D. Rita, e pelo apoio durante as análises dos alunos Micaela, Patrícia e Miguel.

E me sinto feliz por conhecer as pessoas que fizeram parte de alguma forma dos meus dias aqui em Portugal e que estiveram dispostos a me ouvir e a proporcionar momentos de diversão e alegria, amizades das quais levarei as melhores recordações: Neuza, Ilana, Helisa Muhaj, Brisid, Marcelo Velenzuela, Noe, Elba, Juan Quiñones, José Muniz, José Gonçalves, Jean Teixeira, João Ferreira, Fabiana e família, Bruno Escobar, Sara, Pedro e Darpan.

Agradeço à minha família e de modo geral a todos aqueles que passaram pela minha vida e me ensinaram, deixando algo especial, e aos que de certa forma colaboraram na minha formação pessoal e profissional, e que talvez não tenha citado; para com estes toda a minha gratidão e alegria por concretizar mais essa etapa tão importante.

Dedico aos meus pais, Maria Aparecida Miranda e Francisco das Chagas Lima Almeida, por serem meus exemplos de caráter, educação, inspiração e o motivo de toda a minha dedicação. Aos meus irmãos Ingrid e Lucas e meus sobrinhos Felipe e Mateus, pelo amor incondicional e a alegria que me proporcionam.

PARTES DO PRESENTE TRABALHO FORAM JÁ PUBLICADAS:

RESUMOS EM ATAS DE CONFERÊNCIAS NACIONAIS:

Almeida K, Souza VGL, Pires JRA, Augusto ASP, Fernandes PDS, Salvador M, Santos MP, Fernando AL (2017), Propriedades antioxidantes e antibacterianas de biofilmes de quitosano, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.125-126

Augusto ASP, Souza VGL, **Almeida K**, Pires JRA, Fernandes PDS, Santos MP, Salvador M, Fernando AL (2017), Extensão do tempo de prateleira de carne fresca de aves com filmes de quitosana incorporados com extractos hidro-alcoólicos, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.127-128

Pires JRA, Souza VGL, Santos MP, Salvador M, Fernandes PDS, **Almeida K**, Augusto ASP, Fernando AL (2017), Utilização de bionanocompósitos de quitosano/Montmorilonita incorporados com óleo essencial de alecrim na conservação de carne de aves fresca, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.129-130

Souza VGL, Salvador M, Fernandes PDS, Santos MP, Pires JRA, **Almeida K**, Augusto ASP, Fernando AL (2017), Desenvolvimento e aplicação de filmes ativos de quitosano em carne crua de frango, em Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (Ed)., Livro de resumos do 4º Simpósio Nacional SPASS 2017, Promoção de uma alimentação saudável e segura, do nutriente à embalagem – inovação e desafios, 21 de setembro 2017 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, p.131-132

RESUMO

As embalagens funcionam como uma barreira de protecção contra contaminações externas, visando conservar os alimentos por mais tempo. A tendência crescente associada ao fato dos consumidores estarem mais preocupados com produtos seguros, saudáveis, mais próximo ao natural com menores adições de conservantes, tem impulsionado a indústria alimentar na procura de alternativas tecnológicas para conservar os alimentos. Neste contexto, as novas tecnologias de embalagens, nomeadamente as embalagens ativas produzidas a partir de biopolímeros, estão a surgir como uma ferramenta para preservar e melhorar a qualidade dos produtos. Sendo assim, o propósito deste trabalho foi desenvolver bionanocompósitos de quitosano/montmorilonita (MMT) incorporados com extrato hidroalcoólico de alecrim e analisar a sua aplicação como uma embalagem primária na conservação de carne de aves fresca. Os filmes foram elaborados pelo método a frio. À solução filmogénica de quitosano (1,5% m/v) foi incorporada com 2,5% de Cloisite®Na⁺ (m/m quitosano), com o objetivo de reforçar as propriedades de barreira e mecânicas dos filmes produzidos. A exfoliação da nanoargila entre as cadeias poliméricas foi realizada de forma mecânica (3 ciclos de banho ultra-sónico intercalados com agitação ultra-turrax). Os compostos activos (extratos hidro-alcoólicos de alecrim) foram adicionados antes do último ciclo de agitação na proporção de 1,25%, 2,5% e 5% (v/v solução filmogénica). As soluções foram vertidas em moldes de vidro, tendo-se deixado secar ao ar. Filmes sem extrato de alecrim e carne sem filme também foram testados, de modo a ser utilizados como controlo. Foram testados, igualmente filmes com extractos e sem MMT para avaliar o efeito da incorporação da argila. As carnes frescas de aves foram envolvidas nas películas e armazenadas sob refrigeração (5 °C ± 2 ° C) por 15 dias. A carne foi avaliada nos tempos 0, 3, 7, 10 e 15 dias de armazenamento. Realizaram-se análises microbiológicas (contagem dos microrganismos totais viáveis e os coliformes totais) ao longo de 10 dias e análises físico-químicas (pH, acidez, humidade, índice TBARS e cor) na carne, ao longo de 15 dias. Foi realizado um teste para avaliar a migração de compostos fenólicos com actividade antioxidante para o meio. Este teste mostrou que ao longo de dez dias há migração de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante para o meio. As amostras sem qualquer protecção sofreram um rápido processo de deterioração, desde o primeiro dia de armazenamento. Os alimentos embalados apresentaram uma menor degradação, por comparação com as amostras de carne sem filme. A comparação entre a carne envolvida nos bionanocompósitos ativos e a carne sem filme mostrou uma redução de 2 ciclos log sobre a contagem de microrganismos totais, na carne embalada. A cor manteve-se mais estável durante o tempo de armazenagem, mas as carnes sem protecção apresentaram uma maior alteração de cor ao longo do tempo avaliado. O índice TBARS aumentou com o tempo de armazenamento, porém, verificou-se que houve uma tendência para uma menor taxa nas carnes envolvidas em bionanocompósitos. Conclui-se, que os filmes desenvolvidos demonstraram ter potencial antimicrobiano e atividade antioxidante que aumentou com a concentração de extracto

hidroalcoólico de alecrim adicionado ao filme. O MMT não teve grande interferência na actividade dos biofilmes, tendo contribuído para o reforço do material.

Palavras-Chave: Embalagens ativas, biofilmes, quitosano, compostos fenólicos

ABSTRACT

Packaging act as a barrier protection against external contamination, aiming to preserve the food longer. The increased trend associated with the fact that consumers are more concerned about safer and healthier food, closer to nature with minor additions of preservatives, has driven the food industry in the search for alternative technologies to preserve fit. In this context, the new technologies of packaging, including active packaging made from biopolymers, are emerging as tools to preserve and improve the quality of products. Therefore, the films were prepared by the cold method. The film-forming solution of chitosan (1.5% w/v) was incorporated with 2.5% Cloisite®Na⁺ (w/w chitosan), with the objective of enhancing the barrier properties and mechanical properties of the produced films. The exfoliation of the nanoclay between the polymer chains was performed mechanically (3 ultrasonic bath cycles interspersed with Ultra-Turrax stirrer). The active compounds (hydro-alcoholic extracts of rosemary) were added before stirring the last cycle in the proportion of 1.25%, 2.5% and 5% (v / v film-forming solution). The solutions were poured into glass molds and were allowed to air dry. Films without rosemary extract and meat without film were also tested in order to be used as control. It was also tested films with extracts but without MMT to evaluate the effect of clay incorporation. The fresh poultry were wrapped in films and stored under refrigeration (5 ° C ± 2 ° C) for 15 days. The meat was evaluated at 0, 3, 7, 10 and 15 days of storage. Microbiological analyses were carried out (total count of viable microorganisms and total coliforms) over 10 days and physico-chemical analysis (pH, acidity, humidity, color and TBARS content) in the meat over 15 days. The migration test showed that the developed packaging are able to migrate phenolic compounds with high antioxidant activity to the simulant. The samples without any protection undergone a rapid process of deterioration, from the first day of storage. The packaged food suffered lower degradation, compared with filmless meat samples. Comparison between meat wrapped in bionanocomposites and meat without film showed a 2 log cycle reduction of the total count of microorganisms in the packaged meat. The color remained stable during the storage time, but the unprotected meat presented higher color change over time. The TBARS content increased with the storage time, however, meat involved in bionanocomposites showed a trend towards a lower degradation rate. It follows that the developed films have demonstrated antimicrobial activity and antioxidant potential that increased with the increment of the rosemary hydroalcoholic extract added to the film. The MMT had no major interference in the activity of the biofilms, contributing to strengthening the material.

Key words: Active packaging, biofilms, chitosan, phenolic compounds

ÍNDICE

Partes do presente trabalho foram já publicadas:.....	VI
1 Introdução.....	1
1.1 Filmes Biodegradáveis	1
1.2 Embalagens Ativas.....	2
1.3 Quitosano	4
1.3.1 Propriedades do Quitosano.....	6
1.3.2 Aplicações do Quitosano em Embalagens de Alimentos.....	6
1.4 Objectivo do trabalho	7
2 Materiais e Métodos	8
3 Resultados e Discussão	18
3.1 Caracterização da carne	18
3.1.1 Humidade e Cinzas	18
3.1.2 pH e Acidez	21
3.1.3 Oxidação Lipídica (Ensaio de TBARS)	26
3.1.4 Cor	29
3.1.5 Microrganismos totais viáveis (MTV) e Coliformes totais	36
3.2 Análises de Migração	40
4 Conclusão.....	44
5 Referências Bibliográficas.....	46
Anexo I	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura química da quitosano	5
Figura 2.1. Homogeneização da solução Ultra Turrax (IKA T18 digital).....	10
Figura 2.2-Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm	15
Figura 3.1-Resultados obtidos para humidade da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%-controlo,1,25%; 2,5%; 5,0%).	18
Figura 3.2- Resultados obtidos para humidade da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.	19
Figura 3.3- Resultados obtidos para cinzas da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para as carne embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	20
Figura 3.4- Resultados obtidos para cinzas da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para as carnes embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.	20
Figura 3.5- Resultados obtidos para o pH da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para as carnes embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	22
Figura 3.6- Resultados obtidos para pH da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.	23
Figura 3.7- Resultados obtidos para acidez da carne, expressos em ácido oleico. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	25
Figura 3.8- Resultados obtidos para acidez da carne, expressos em ácido oleico. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.....	25
Figura 3.9- Resultados obtidos para TBA da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	26
Figura 3.10- Resultados obtidos para TBA da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.	28
Figura 3.11- Resultados obtidos para parâmetro a* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	29

Figura 3.12- Resultados obtidos para parâmetro b^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	30
Figura 3.13. Resultados obtidos para parâmetro L da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	30
Figura 3.14- Resultados obtidos para parâmetro a^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	32
Figura 3.15- Resultados obtidos para parâmetro b^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	32
Figura 3.16- Resultados obtidos para parâmetro L da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	33
Figura 3.17- Resultados obtidos para variação de cor da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	33
Figura 3.18-Resultados obtidos para a variação da cor. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes com diferentes concentrações de extrato de alecrim (1,25%; 2,5%; 5%) e grupo controlo, sem MMT.	34
Figura 3.19-Resultados obtidos para o ângulo de Hue. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	34
Figura 3.20-Resultados obtidos para o ângulo de Hue. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	35
Figura 3.21-Resultados obtidos para a quantidade de microrganismo totais viáveis. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporado com MMT com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	36
Figura 3.22-Resultados obtidos para a quantidade de microrganismo totais viáveis. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.	37
Figura 3.23-Resultados obtidos para a presença de coliformes. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).	38
Figura 3.24-Resultados obtidos para a presença de coliformes. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.	39

Figura 3.25- Teste de migração de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias, com MMT. Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).	40
Figura 3.26-Teste de migração de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias. Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ)	41
Figura 3.27- Teste de DPPH de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias, com MMT. Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).	42
Figura 3.28- Teste de DPPH de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias. Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Formulação dos filmes ativos.....	9
Tabela 3.1- Parâmetro de cinzas da carne de frango com biofilmes e montimorilonite (MMT). 21	
Tabela 3.2-Parâmetro de pH da carne de frango com biofilmes e montimorilonite (MMT).	24
Tabela 3.3-Índice de TBA da carne de frango com biofilmes e montimorilonite (MMT).....	28

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLA

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

GRAS – Generally Recognized as Safe (reconhecido como seguro)

pH – Potencial hidrogeniônico

UV / VIS – Ultravioleta / Visível

EHA- Extrato hidroacoolico de alecrim

MMT - Montmorilonita

TBA- Thiobarbituric acid reactive substances

MDA- Malondialdeído

FAO- Food and Agriculture Organization

SF- Solução Filmogénica

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

MTV- Microrganismos Totais Viáveis

1 INTRODUÇÃO

1.1 FILMES BIODEGRADÁVEIS

Nos últimos anos, os biopolímeros têm sido largamente investigados, devido à sua não toxicidade, à sua biodegradabilidade e renovabilidade, (Fernando et al., 2015; Leceta et al., 2013). São, desta forma, uma solução viável para a eliminação de resíduos de plástico convencionais, derivados do petróleo, cujo crescente consumo tem provocado uma série de preocupações ambientais. Estes factores aliados à capacidade de prolongar a vida de prateleira de produtos alimentares têm conduzido ao estudo da sua utilização em embalagens de alimentos (Abdollahi et al., 2012; Atarés et al., 2016).

Esses filmes biodegradáveis funcionam como excelentes veículos para incorporação de uma variedade de aditivos, tais como, antioxidantes, agentes antifúngicos, agentes antimicrobianos, e outros componentes. Estes podem melhorar as propriedades dos biofilmes no sentido de aumentar a sua bioactividade, de modo a evitar a contaminação e proliferação de microrganismos (Abdollahi et al., 2012; Nascimento et al., 2013), ou de retardar fenómenos de degradação como a oxidação.

Existem vários métodos para a preparação de biofilmes: coacervação simples, coacervação complexa, gelificação ou coagulação térmica, extrusão, *casting* entre outros (da Silva et al., 2016; Villadiego et al., 2005; Horst et al., 2009). A produção destes biofilmes pelo método *casting* está baseada na composição de um solvente (água, etanol ou ácidos orgânicos) na dispersão ou solubilização dos biopolímeros com posterior adição de aditivos (plastificantes ou agentes de liga) até se obter uma solução ou uma rede polimérica (Tharanathan, 2003).

Neste trabalho utilizou-se o método a frio com solventes (*casting*), de fácil preparo em laboratório, que se baseia na aplicação da suspensão filmogénica do filme preparado em uma superfície lisa e que a seguir é colocada para secar em temperatura ambiente. Na indústria, os filmes podem ser processados pelos mesmos métodos utilizados para filmes plásticos flexíveis, como extrusão e co-extrusão para filmes multicamadas, através da secagem em rolos para remoção do solvente da solução polimérica (Durango et al., 2005).

Os polissacarídeos e as proteínas, biopolímeros naturais, são matérias de grande interesse para fabricação de biofilmes degradáveis biologicamente, devido a sua abundância, e por serem renováveis e capazes de formar uma matriz contínua (Fernando, 2006; Henrique et al., 2008).

Entres os biopolímeros, que apresentam capacidade para formação de filmes, estão as proteínas, como o glúten do trigo, as proteínas do leite, da soja e do milho, o colágeno e as gelatinas de origem animal, polissacarídeos, como a celulose, o amido, alginatos, quitosano, pectinas e diferentes gomas e lipídios, como as ceras e os ácidos gordos (Tharanathan, 2003).

As bioembalagens para cobertura de produtos são divididas em dois tipos: os filmes e os revestimentos. Estes são classificados em três grupos, de acordo com suas estruturas: hidrocoloidais (proteínas e polissacarídeos), lipídicos (tais como ácidos gordos, ceras) e compostos (Dashipour et al., 2015).

Nos últimos anos as bioembalagens têm ganho atenção especial na indústria de alimentos. Devido as suas características de biodegradabilidade, e outras vantagens já enumeradas, porém, estas embalagens apresentam desvantagens em relação aos sintéticos, como a baixa eficiência em propriedades de barreira e mecânicas e custos mais elevados (Franchetti & Marconato, 2006; Durango et al., 2005; Souza & Fernando, 2016).

1.2 EMBALAGENS ATIVAS

Os consumidores estão cada vez mais informados e preocupados com a segurança e qualidade alimentar e também com as questões ambientais (Dutta et al., 2009). Optando por alimentos com menores teores de aditivos químicos ou mesmo por aqueles que contêm preservativos (compostos com atividades antimicrobianas ou antioxidantes) de origem natural (Shahidi et al., 1999).

Desta forma, a indústria alimentar procura alternativas viáveis (do ponto de vista económico, tecnológico e de segurança alimentar) através de novas tecnologias de embalagens que possam atender boa parte deste novo estilo de consumidores (Quintavalla e Vicini, 2002; Aider, 2010): as embalagens ativas. Embalagens ativas podem ser definidas como aquelas que interagem de forma desejável com o alimento, melhorando algumas de suas características (Braga & Peres, 2010). A diferença desta embalagem para outras é que além da proteção externa, podem ter algumas funções adicionais em relação as embalagens passivas, prolongando a vida útil dos alimentos (Soares et al., 2009).

Dentre essas funções, pode-se destacar alguns exemplos: substâncias absorvedoras de oxigénio, de etileno, de humidade e de odores, ou outras que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas (Dutta et al., 2009). Nestas, embalagens, para promover a proteção externa e outras funções, são

incorporados ingredientes ativos diretamente nas embalagens ou utilizando polímeros funcionalmente ativos (Oliveira & Oliveira, 2004).

Sendo assim, as embalagens ativas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de prolongar a vida útil do produto ao mesmo tempo que mantêm ou melhoram a qualidade do alimento embalado, por meio dos componentes ativos incorporados em sua matriz, que podem absorver substâncias indesejadas ou libertar compostos ativos desejáveis na matriz alimentar (Bolumar et al., 2011).

Muitos estudos recentes têm sido realizados neste âmbito do conhecimento científico, principalmente para aplicações em alimentos (Manso et al., 2013), através de filmes antimicrobianos (Avadi et al., 2004) e filmes antioxidantes, os quais veem apresentando bons resultados (Georgantelis et al., 2007).

A deterioração dos alimentos é causada por agentes microbianos e por reações oxidativas (Garrido et al., 2011). Portanto, utilizam-se agentes antimicrobianos e antioxidantes para manter a qualidade dos produtos (Kanatt et al., 2008). Em geral os alimentos apresentam um crescimento microbiano superficial, e uma oxidação superficial, por essa razão há a necessidade de um material que entre em contacto direto com o produto. Existem vários compostos sintéticos e naturais que vêm sendo estudados por apresentar alto potencial antimicrobiano e antioxidante (Oliveira & Oliveira, 2004).

Os agentes antimicrobianos mais utilizados em filmes para alimentos são: ácidos orgânicos, quitosano, nisina, lactoperoxidase, extratos e óleos essenciais de plantas (Espitia et al., 2012; Campos et al., 2011). Como agentes antioxidantes têm-se utilizado os óleos essenciais ou extractos ricos em polifenóis, os quais também apresentam atividade antimicrobiana (Pascoal et al., 2015). Alguns agentes naturais que apresentam potencial antioxidante são: os ácidos fenólicos (α -tocoferol), ácidos orgânicos (ácido ascórbico), extrato de plantas (alecrim, chá verde, orégãos, etc.) e poliaminas (espermina e espermidina) (Portes et al., 2008). Georgantelis e colaboradores (2007) observaram em seus estudos atividade antioxidante do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), por conter vários diterpenos fenólicos, tais como, ácido carnosico, carnosol, o rosmanol, rosmariquinone e rosmaridionol.

Estes agentes antimicrobianos/antioxidantes podem ser adicionados de forma direta à matriz polimérica, em rótulos, etiquetas ou estar contidos em pequenos sacos (Oliveira e Oliveira, 2004). A incorporação destes podem ser efetuada de duas formas: incorporação e imobilização. Na incorporação o agente é libertado para o alimento, já na imobilização o composto opera apenas à superfície do filme (Soares et al., 2009). Esses agentes apresentam duas grandes vantagens de utilização: os componentes

atuam especialmente na superfície dos alimentos, onde há maior concentração de microrganismos e ocorrência de reações de oxidação e por serem agentes naturais proporcionam uma redução na ingestão de conservantes sintéticos por parte dos consumidores (Quintavalla & Vicini, 2002, Soares et al., 2009). Por essa razão a preferência por estudos com substâncias naturais tem aumentado, verificando-se nestas a capacidade de migrar e retardar o processo oxidativo e proliferativo da contaminação microbiana durante o armazenamento.

Bolumar et al. (2011) utilizou extrato de alecrim para desenvolver embalagens antioxidantes para rissóis de carne de frango, com posterior tratamento de alta pressão. E verificou que a embalagem ativa (aliada ao tratamento por alta pressão) foi capaz de atrasar em até 25 dias a oxidação lipídica e também proporcionou uma extensão da vida útil do produto.

Manso et al. (2013) utilizou embalagens ativas (PET ativa) à base de óleo de canela, como agente antimicrobiano, para desempenhar efeitos antifúngicos. Os resultados combinados demonstraram eficácia do composto sobre a durabilidade do efeito antifúngico, que obteve inibição total durante dois meses a 25°C.

Portanto esse tipo de embalagem têm sido um meio promissor não só para prevenir ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deterioradores, retardar reações oxidativas nos alimentos, mas também como uma alternativa mais ecológica às embalagens de plásticos tradicionais (Dutta et al., 2005, Soares et al., 2009).

Porém, os biopolímeros como embalagens ativas ainda têm sido pouco investigados, apesar de suas vantagens de sustentabilidade e propriedades benéficas (Durango et al., 2005). As proteínas, por exemplo, apresentam boa capacidade de plasticidade e elasticidade, além desta ser abundante na natureza (Pereda et al., 2008).

Um dos biopolímeros frequentemente utilizado para o revestimento de embalagens ativas biodegradáveis é o quitosano. Por apresentar propriedades particulares, ser um agente natural e versátil, é alvo de muitas pesquisas. E também por apresentar várias possibilidades de aplicações, tais como, soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas. Contribuindo para um amplo espectro de aplicações na indústria alimentar (Fai et al., 2008).

1.3 QUITOSANO

O segundo polissacárido mais abundante na natureza depois da celulose, é o quitosano, ou poli(1,4)-2-amido-2-desoxi- β -D-glucose (Figura 1.1), um biopolímero linear, do tipo polissacárido, obtido a partir da quitina (Aider, 2010). É um composto de

forma desacetilada (em diferentes graus) de quitina, que, ao contrário de quitina, é solúvel em soluções ácidas (Shahidi et al., 1999).

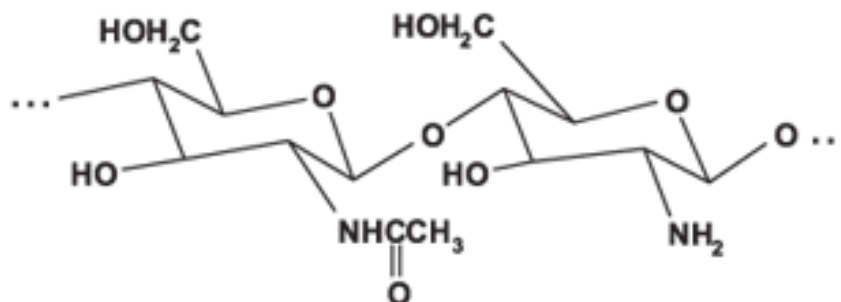


Figura 1.1. Estrutura química da quitosano

Pode ser encontrado naturalmente no exosqueleto de crustáceos (fonte para obtenção de quitina e quitosano), paredes celulares de fungos e outros materiais biológicos. Verifica-se que para além de ser natural e biodegradável, o quitosano não é tóxico, é biocompatível, biofuncional e renovável. (Devlieghere, 2004; Pranoto et al., 2005).

A eficácia do quitosano em filmes é devido à presença do grupo amino na posição C2, que possibilita maior funcionalidade para as necessidades biotecnológicas (Figura 1.1), peculiarmente, em aplicações alimentares. Esse polissacárido mostrou-se efetivo em sua aplicação em películas antimicrobianas comestíveis, em imersão e pulverização para os produtos alimentares (Dutta et al., 2009).

Neste contexto, é plausível considerar, que os biofilmes à base de quitosano são embalagens ativas, pela suas propriedades de atuar como uma barreira a agentes externos, possuir baixa permeabilidade a gases (CO₂ e O₂), e outras funções desejáveis (Vargas et al., 2009).

Entretanto, a sua aplicação está limitada por seu alto custo em relação aos plásticos, escurecimento (aparência de cor amarelada) ao longo do armazenamento, dificuldade no seu manuseamento a temperaturas elevadas, e relativamente baixa barreira ao vapor de água. Por esta razão são adicionados outros compostos para melhorar esta função (Nascimento et al., 2013).

Para melhorar as propriedades de barreira, podem ser incorporados aditivos para melhorar o desempenho das embalagens poliméricas, como por exemplo sólidos em camadas inorgânicas, como silicato e argila (Nascimento et al., 2013). Uma argila frequentemente utilizada para filmes é a montmorilonita (MMT). Essa argila contribui para melhorar as propriedades de barreira a gases e água. Muitos estudos apontam a eficiência das argilas na diminuição da permeabilidade ao vapor de água e oxigênio (De Azeredo, 2009).

Para aumentar a flexibilidade e a maleabilidade de filmes, é comum adicionar agentes plastificantes à dispersão filmogénica. O agente plastificante frequentemente utilizado é o glicerol, por apresentar propriedades que melhoram a flexibilidade dos filmes (Srinivasa & Tharanathan, 2007).

1.3.1 PROPRIEDADES DO QUITOSANO

O quitosano é capaz de atuar como agente antimicrobiano sobre os fungos e bactérias, no entanto, devido a sensibilidade destes microrganismos ao biopolímero diferem entre si. As bactérias gram-negativas apresentam maior resistência. Já, os bolores e leveduras são os mais sensíveis à ação do polissacarídeo, seguidos pelas bactérias gram-positivas (Aider, 2010; Dutta et al., 2009). O quitosano é reconhecido como GRAS (generally recognized as safe), pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, e diversos estudos tem verificado as suas propriedades potenciais para preservação de produtos cárneos (Kanatt et al., 2013; Véronique 2008). Os estudos de Kanatt et al. (2013) verificaram boa capacidade contra uma gama de microrganismos de origem alimentar. Entretanto, seus estudos mostraram que as propriedades antioxidantes do quitosano foi potencializada com a incorporação de extrato de hortelã, para preservação de carnes e seus produtos derivados.

Outra propriedade do quitosano é formar filmes transparentes, apresentando potencial para ser utilizado como embalagem para uma variedade de produtos alimentares e revestimento protetor comestível. Além disso, apresenta vantagens em relação aos outros materiais por sua capacidade de incorporar substâncias funcionais, como minerais ou vitaminas (Dutta et al., 2009; Srinivasa & Tharanathan, 2007).

Este biopolímero dissolve-se facilmente em soluções de ácidos fracos devido à protonização dos seus grupos aminas, sendo o solvente mais usado o ácido acético (Abdollahi et al., 2012). E como observado nos estudos de Georgantelis et al. (2007) também apresenta a capacidade de absorver nutrientes utilizados por bactérias e, como tal, contribuindo para dificultar o seu crescimento.

O quitosano ainda pode ser usado na imobilização e purificação de enzimas e como aditivo para a produção de novos produtos alimentares, modificando as propriedade gelificantes, estabilizadoras e de espessamento, entre outras. Este polímero apresenta a capacidade de quebrar ligações lipídicas, o que é considerado uma importante propriedade (Boyanova, 2005).

1.3.2 APLICAÇÕES DO QUITOSANO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS

Por ser um biopolímero muito versátil, o quitosano está a ser solicitado por vários sectores, como a indústria alimentar, na agricultura, farmácia biomédica e cosmética,

sob forma de filmes, fibras, capacidade de formar géis, entre outras. É também utilizada em pastilhas elásticas para reduzir as bactérias orais (Costa et al., 2008; Hayashi et al., 2007; Srinivasa & Tharanathan, 2007).

Em algumas pesquisas recentes verificou-se que a aplicação de filmes de quitosano em produtos cárneos diminui a proliferação de microrganismos patogénicos. Mostrou-se ainda que esta redução é maior quando são incorporados óleos essenciais em sua matriz, sendo uma opção de uso em embalagens ativas e uma alternativa, no sentido do controlo e prevenção de patogénicos em produtos alimentares (Zivanovic et al., 2005). Estudos realizados por Pranoto et al. (2005) verificaram que a quitosano apresenta um bom potencial para ser misturado com outros agentes antimicrobianos, e aumentar o seu potencial bioactivo. Estes autores incorporaram o óleo de alho em filmes de quitosano, proporcionando uma barreira física e antimicrobiana à contaminação alimentar, o qual contribuiu de forma moderada para as características mecânicas e propriedades físicas.

Entretanto, assim como as embalagens convencionais, as embalagens produzidas a partir de biocompósitos devem apresentar um número de funções importantes, incluindo proteção dos alimentos, garantindo a qualidade e segurança sensorial e comunicação de informações aos consumidores (Sorrentino e Vittoria, 2007).

1.4 OBJECTIVO DO TRABALHO

Com este trabalho pretendeu-se estudar a atividade antioxidante e antimicrobiana de biofilmes à base de quitosano, com montmorilonita (MMT) e sem montmorilonita (MMT) e incorporados com extrato hidroalcoólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). De forma específica, pretendeu-se:

- Produzir biofilmes de quitosano com incorporação de um agente de nanoreforço, nomeadamente a MMT, e de extratos hidroalcoólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes concentrações..
- Avaliar o efeito dos biofilmes produzidos na conservação de carne de frango fresca por meio de análises físico-químicas e microbiológicas ao longo do tempo de armazenamento (15 dias).
- Realizar estudo *in vitro* de migração dos compostos ativos para um meio de simulante de alimentos oleosos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios 145 e 373 do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, em Portugal.

2.1 Material

Todos os reagentes químicos utilizados são de grau pureza analítico e a água purificada utilizando-se sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Foram utilizados nos ensaios para a preparação do biofilme e para as análises físicoquímicas: Nano-argila montmorillonite Cloisite Na⁺ (Southern Clay Products, TX – USA); quitosano (Sigma Aldrich, Islândia), extrato hidro-alcoólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) preparado a partir de plantas desidratadas adquiridas em comércio local; ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents; GP: 99,8%), glicerol (Labchem, Portugal), hidróxido de sódio e ácido tricloroacético (TCA, GP: 99%) foram comprados da Alfa Aesar (Alemanha), enquanto que etanol absoluto, 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP; GP: 96%), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, GP 98%), galato de propilo e EDTA fornecidos pela Sigma Aldrich (Alemanha). Reagentes e meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas (cloreto de sódio, triptona, meio plate count agar (PCA) e caldo verde brilhante) comprados na Biokar (França).

2.1.1 Preparação dos extratos hidroalcoólicos de alecrim (EHA)

O extrato hidroalcoólico de alecrim (EHA) foi preparado por meio de extração sólido líquido (etanol 70% (v/v)) utilizando-se um banho ultrasónico de acordo com metodologias descritas por Souza et al. (2017) com modificações. Previamente ao processo de extração, a planta foi moída num moinho elétrico (ProfiCook model KSW 1021, Alemanha) de modo a aumentar a superfície de contato com o solvente e otimizar o processo de extração dos compostos fenólicos. Resumidamente, 5 g de alecrim foram pesados na balança analítica Mettler Toledo (modelo AB204, Suíça) e misturados com 50 mL de etanol 70% (v/v) utilizando o ultraturrax® (Model IKA®T18, Alemanha). A mistura foi mantida sob refrigeração (7 °C ± 2 °C) ao abrigo da luz durante aproximadamente 24h, e então submetidos ao banho de ultrasons durante 30 min / 50 Hz (Selecta, Barcelona, Spain). O sistema foi submetido à centrifugação durante 30 min a 4 °C com força de 10000 G (Sigma model 4K15, Alemanha), e o sobrenadante removido. Posteriormente, o processo foi repetido (dupla extração). Os sobrenadantes

combinados de ambas extrações foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 4, e concentrados no rotavapor até ao volume final de 25 mL, o extrato foram mantido a -18 °C até sua utilização.

2.2 Preparação dos Filmes

Biofilmes de quitosano foram preparados à partir de uma suspensão filmogénica (SF) de 1.5% (m/v) de quitosano em 1% (v/v) ácido acético glacial de acordo com metodologia descrita por Siripatrawa e Harte (2010) com modificações. Foram preparados filmes com 0% (Controlo), 1,25%; 2,5% e 5% de EHA, com e sem MMT Na⁺. Para a completa solubilização do quitosano, o sistema foi mantido sob agitação (agitador magnético Retsch) por aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente.

Para cada filme verteu-se 140 mL da SF para um copo de 250 mL, adicionou-se 0,0525g (2,5% m/m de quitosano) de MMT Na⁺ (pesada na balança Denver Instrument Company TR-204) e 20 gotas de glicerol, equivalentes a 60% (m/m quitosano). Levou-se os copos durante 2 min ao Ultra Turrax (IKA T18 digital) a 15 000 rpm para homogeneizar a solução (Figura. 2.1). Realizou-se por duas vezes o seguinte ciclo de agitação: 15 min Ultrassom (JP Selecta) + 5 min Ultra Turrax. Antes do último ciclo de agitação os EHAs foram adicionados nas proporções descritas na Tabela 2.1. Foram preparados filmes aos quais não foi adicionado o MMT Na⁺.

Tabela 2.1. Formulação dos filmes ativos

Filmes	Extrato Alecrim(mL)
Controlo	0
1,25%	1,75
2,5%	3,5
5%	7



Figura 2.1. Homogeneização da solução Ultra Turrax (IKA T18 digital)

A solução filmogénica final foi homogeneizada durante 5 min no Ultrassom e vertida para formas de vidro 25 cm x 18 cm e deixou-se repousar à temperatura ambiente e ao abrigo de luz até à secagem natural dos filmes (aproximadamente 3 dias).

2.3 Análises de Migração

Quando se trata do desenvolvimento de embalagens ativas, avaliar a migração, ou seja a libertação dos compostos ativos da matriz polimérica é fundamental para caracterizar a ação deste por meio da difusão dos compostos que são adicionados para os alimentos embalados, em que poderá resultar num efeito protetor sobre o alimento (López-de-Dicastillo et al., 2012).

As embalagens de alimentos e outros plásticos podem conter alguns aditivos, assim como outros contaminantes (Helmroth et al., 2002). Esses aditivos plásticos, que geralmente são utilizados para melhorar as propriedades dos polímero, podem migrar para os alimentos, ou seja, ocorre uma transferência de substâncias provenientes das paredes da embalagem do produto, por fenómenos de natureza físico-química (Canedo 2007). O estudo da difusão dos componentes da embalagem para os alimentos pode permitir aumentar o conhecimento sobre a atividade das embalagens e como esta pode ser potenciada.

2.3.1 Compostos fenólicos totais

Para determinar a migração de compostos fenólicos dos nanocompósitos ao longo do tempo realizou-se um teste de difusão, utilizando uma solução de 95% de etanol (alimentos gordurosos) como meio simulante. A concentração dos compostos fenólicos totais no meio simulante foram determinadas periodicamente pelo método de Folin-Ciocalteu. Adicionou-se 1mL do meio simulante, 1 mL de etanol 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, adiciona-se 1 mL de carbonato de sódio (5% m/v), e logo após 60 minutos em temperatura ambiente, realiza-se a leitura da absorvância no comprimento de onda de 760 nm, no espectrofotômetro UV/VIS. O ácido gálico (0-200 mg.L⁻¹) foi utilizado em diferentes concentrações para a construção da curva analítica (López-de-Dicastillo et al.,2012).

2.3.2 Atividade Antioxidante “*in vitro*”

Para determinar a atividade antioxidante dos filmes ativos utilizou-se o método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) de acordo com metodologia descrita por López-de-Dicastillo *et al.* (2012) e Vieira et al. (2011), que se baseia na redução do radical DPPH, que ao fixar um H (removido do antioxidante analisado), resulta na diminuição da absorvância.

Em 3 mL de solução metanólica de DPPH 60 µMol foi adicionado uma alíquota de 1 mL do meio simulante e incubado ao abrigo de luz à temperatura ambiente (25 ° C ± 1 °C) por 20 minutos. Logo após realizou-se a quantificação, através do espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 517 nm pela leitura da absorvância. A percentagem de inibição foi calculada usando a Eq. 8. Como controle será utilizado 1 mL de etanol 95%.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

2.4 Preparação das amostras (Embalagem da carne) e análise

Para a preparação da amostra foi utilizada carne fresca de frango picada adquirida no comércio local. A carne (porções de 30 g), foi envolvida nos bionanocompósitos produzidos (cada porção em tiras de 5 x 18 cm), sendo depois acondicionada em potes plásticos esterilizados com tampa rosqueada. O sistema foi armazenado sob refrigeração (4 ± 2 °C) durante 15 dias.

Além dos bionanocompósitos sem incorporação do extrato de alecrim (controle), também foi considerado o tratamento controle carne sem filme, ou seja, carne picada acondicionada nos potes plásticos (C2), para simular a condição sem embalagem. Foram testados filmes com e sem MMT Na⁺. Esse processo foi realizado em duas repetições, e o produto avaliado nos tempos 0, 3, 7, 10 e 15 dias de armazenagem, sendo que em cada repetição foram testados em duplicado cada filem produzido. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos de pH, acidez total, cor, humidade, e cinzas, assim como o grau de oxidação lipídica (TBARs), e ainda a contaminação microbiológica (não foi realizada no tempo 15).

2.4.1 Determinação do pH e acidez

A qualidade da carne também pode ser analisada através do pH, que apresenta uma correlação íntima com a cor. A pH elevado, a hemoglobina tem o ferro do hemo no estado ferroso (+2) e a pH baixo no estado férrico (+3), sendo que o estado ferroso se associa à coloração vermelha e mais saudável da carne. O estado férrico associa-se a cor acastanhada da carne degradada pela presença de ácidos gordos livres, responsáveis pela descida do pH. Um teor mais elevado de ácidos gordos livres está associado a um maior grau de degradação (Barbut, 2009).

O pH e a acidez total foram determinados de acordo com metodologia descrita por IAL (2008) pesou-se (balança Explorer Pro- Ohaus) 5 gramas de carne e adicionou-se 50 mililitros de água Mili-Q a 40°C (placa P-Selecta Combiplac), que ficou em agitação (placa de agitação ASINCRO) por 15 minutos. Logo após foi realizada uma filtração simples (filtro Fioroni) e fez-se a leitura do pH através do medidor de pH e temperatura digital (CRISON micropH 2001).

Relativamente à acidez, pretende-se neutralizar os ácidos gordos livres recorrendo a uma base forte, e posteriormente calcular a percentagem de ácidos gordos livres com o volume de titulante usado (IAL, 2008). Após a medição de pH, foram colocadas 3 gotas de fenolftaleína e efetuou-se a titulação com NaOH 0,1 N até a solução mudar para cor rosa. Posteriormente aplica-se a fórmula matemática (Eq.2):

$$\text{Ácidos gordos livres (\%)} \text{ácido oleico (n/m)} = (V * N) / (M) * 28,2 \quad (\text{Eq.2})$$

Onde:

V- Volume de titulante (mL)

N- Concentração do titulante em equivalentes por litro

M- Massa de amostra utilizada (g)

2.4.2 Determinação da Cor

A cor é uma característica relevante no momento da compra, pois, para o consumidor reflete qualidade, que é a primeira avaliação para escolha do produto. Devido à presença hemoglobina, a carne apresenta uma cor avermelhada. Quanto maior a concentração desta proteína, mais escura a carne (Venturini et al., 2007). No entanto a carne de aves apresenta uma cor mais clara, muitas vezes amarelada ou acinzentada. Isto deve-se à menor quantidade de gordura e menor quantidade de mioglobina em certos músculos. Através da análise da cor, que é um indicador de alterações das propriedades funcionais, pode-se verificar que a cor avermelhada está relacionada com o seu estado de oxidação. Quanto mais oxidada a carne mais amarela se vai apresentar, e vai ter também um aspecto mais brilhante devido aos ácidos gordos. Para a avaliação deste parâmetro, adicionou-se uma quantidade de carne numa placa de Petri e analisou-se através do colorímetro (CHROMA METER CR-410). Obteve-se 3 parâmetros: a^* , b^* e L , respetivamente, a variação da cor entre vermelho e verde; a gama entre amarelo e azul; e a luminosidade (Qiao et al, 2001). A mudança de cor é o parâmetro que avalia a cor ao longo do tempo (Eq. 3). E através do Ângulo de Hue determinou-se a tonalidade da cor (Eq. 4). (Harder et al. 2007).

$$\Delta E = \sqrt{((L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2)} \quad (\text{Eq.3})$$

$$\text{Angulo hue} = \tan^{-1}(b/a) \quad (\text{Eq.4})$$

2.4.3 Determinação da humidade e cinzas

A água nos alimentos é um dos seus principais constituintes, servindo principalmente como meio de transporte entre o interior e exterior das células. A água influencia directamente na atividade microbiana, e a temperatura e a humidade devem ser considerados na armazenagem dos alimentos, pois quanto maior a temperatura, menor será a humidade, e vice-versa. Portanto, para que não ocorra a proliferação de microorganismos, ou para que seja retardada a sua multiplicação, é necessário utilizar técnicas que visam secar os alimentos para que durem mais tempo, como a desidratação ou a salga (Baptista e Venâncio, 2003).

Para calcular a percentagem de humidade na carne, ou seja, para saber a quantidade de água presente nos tecidos. Seguindo a metodologia de IAL (2008) e Fernando (1996, 2015), pesou-se (balança Explorer Pro- Ohaus) cerca de 2 gramas de carne de frango em pesa filtros. Logo após a carne foi colocada na estufa (Estufa WTB

binder) a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 horas, ao fim desse tempo, foram dispostas no exsiccador, para não ganhar humidade do ar, até atingir a temperatura ambiente e volta a pesar-se, até peso constante. A diferença no peso entre o peso inicial e peso final resulta na percentagem de humidade da carne (Eq. 5).

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{(PF2-PF3)}{(PF2-PF1)} * 100 \quad (\text{Eq.5})$$

PF1- Tara do pesa filtro;

PF2- Massa do pesa filtro + 2g da amostra antes de secagem na estufa;

PF3- Masa do pesa filtro + 2g da amostra após secagem na estufa.

Para a determinação de cinzas é possível calcular toda a matéria não orgânica presente na amostra, após a calcinação (IAL, 2008). Após avaliar a humidade a amostra foi submetida à mufla (Mufla Heraeus Hanaua) a 550°C durante 2 horas. No fim desse tempo voltou ao exsiccador e pesou-se à temperatura ambiente. E por fim, com as diferenças de peso antes e depois da mufla é possível obter a percentagem de matéria não orgânica na carne (Eq. 6).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{(P1-P2)}{P3} * 100 \quad (\text{Eq.6})$$

P1- Peso da capsula + cinza após mufla

P2- Tara da capsula

P3- Peso da amostra, antes da mufla

2.4.4 Determinação do índice TBARs

A rancidez, ou oxidação de lipídios nos alimentos é uma deterioração que define a vida útil do produto, por causar efeitos indesejáveis sensorialmente e destruir as vitaminas lipossolúveis e ácidos gordos essenciais. O teste mais comum para avaliar a oxidação de lipídios em carnes e nos produtos cárneos é o teste de TBA, por se rápido e simples (Osawa et al., 2005).

Durante o processo oxidativo ocorre a decomposição de um dos principais produtos dos hidroperóxidos de ácido gordos polinsaturados, chamado de malonaldeído (MDA) - é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilos nos carbonos C-1 e C-3. O teste de TBA irá quantificar o MDA existente (Angelo, 1996).

O processo envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído (Figura 2.2), em que essa reação forma um complexo de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar de 500 a 550 nm).

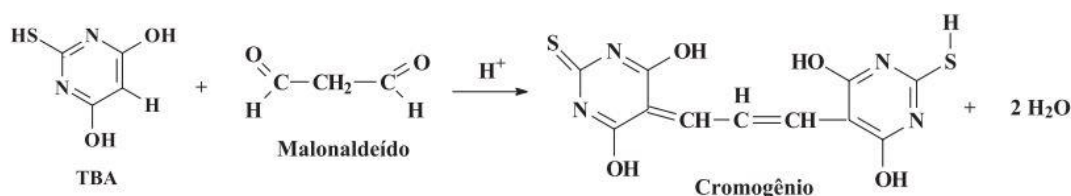


Figura 2.2-Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm

O teste do TBA consiste na determinação do índice de ácido tiobarbitúrico na carne de frango, ou seja, a quantidade de aldeído malônico em miligramas por 1000 gramas de produto.

Para este teste utilizou-se uma solução de TCA, preparada em um balão de 200ml, foi adicionado 15g de ácido tricloroacético, 2ml de uma solução etanólica de galato de propilo 5% (m/v) e 0,2g de EDTA, por fim perfazendo o volume do balão com água Milli-Q. Preparu-se uma solução de TBA 0,02 M em água Milli-Q.

Para realização da reta padrão foi utilizado TEP, conhecido como 1,1,3,3-tetraetoxipropano que, em condições ácidas, sofre hidrólise e liberta o malondialdeído. A quantificação de malonaldeído (MDA) será feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA, utilizando-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). A curva é montada utilizando-se 5 tubos contendo 5 mL de TCA e quantidades crescentes, 10 a 50 μ L, de TEP 10^{-3} M. Para as análises das carnes, foram pesadas 5 gramas de cada tratamento (balança Explorer Pro- Ohaus) e colocados a agitar (placa de agitação ASINCRO) com 10 mililitros de TCA durante 1 hora. No fim desse tempo realizou-se uma filtração simples (filtro Fioroni) e foram retirados 5 mililitros para um tubo de ensaio. Nesse tubo coloca-se também 5 mililitros de TBA, e a mistura é conduzida ao banho maria (Banho de aquecimento Memmert) a 95°C durante meia hora. Após arrefecimento, realizou-se a leitura à temperatura ambiente a 530 nm. Para o branco utilizou-se TCA. Os resultados serão expressos em mg de MDA/kg de amostra e foram calculados pela seguinte (Eq. 7).

$$\text{Índice de TBA (mg/kg)} = 72,06 * c * (10 + m * H) / (m * v) \quad (\text{Eq.7})$$

c- quantidade do malonaldeído (µmol) – obtida da absorvância lida e recta padrão

v- volume da toma (mL)

H- Humidade da amostra (g/g)

m- massa da toma de ensaio (g)

2.4.5 Análises microbiológicas

2.4.5.1 Microrganismos totais viáveis

Os alimentos têm características propícias para o desenvolvimento de microrganismos. A carne é um meio suscetível ao crescimento de microrganismos, devido à sua gordura, humidade, pH e outras características que são boas condições para o desenvolvimento dos mesmos. Alguns fatores exteriores também poderiam contribuir para contaminações, como a temperatura, gases presentes na atmosfera e humidade relativa. A carne de aves, principalmente a de frango, é a que causa maior número de transmissões de microrganismos patogénicos (Dilbaghi e Sharma, 2007).

Para determinar os microrganismos totais viáveis, foram pesadas 1 g de carne para um copo estéril com tampa e adicionou-se 9 mL de solução de diluição (a 1g de triptona juntaram-se 8,5 g de NaCl para 1L de água, estéril), e foram feitas diluições seriadas em tubos de ensaio (esterilizados através da utilização do autoclave (K400, Darlab)). Posteriormente, foram inoculados 1 mL de diversas diluições no meio de cultura PCA (23,5g de PCA em 1L de H₂O destilada, esterilizado em autoclave). As placas foram então incubadas, durante 72 ± 3 h na estufa (Mettler) a 30±1°C. Todo este processo de preparação das diluições e da incorporação em placa foi realizado numa câmara de fluxo laminar (modelo 1 HELIOS 48, STERIL-HELIOS), para impedir a contaminação das placas. Ao fim do tempo de incubação foram contadas o número de colónias que cresceram nas placas, e os resultados expressos em logaritmo das unidades formadoras de colónia (Log (UFC/g de carne)) (ISO 4833-1:2013).

2.4.5.2 Coliformes totais

Os coliformes são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, dentre os quais estão todas as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogénicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que tem a capacidade de fermentar

a lactose, a temperaturas específicas de 35-37 °C, produzindo ácido e gás. Consideram-se, a par dos coliformes fecais, os indicadores mais utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e água para o consumo humano (Macedo, 2016; Mendes, 2013).

A contagem de coliformes totais pelo número mais provável foi realizada de acordo com a norma (ISO 4831:2006). Preparou-se o caldo verde brilhante (40 g de caldo verde brilhante em 1 L de água desionizada, esterilizado em autoclave), este meio favorece o crescimento de bactérias coliformes, e por isso é possível confirmar a sua presença na carne. Foram então inoculadas com quantidades adequadas as diluições preparadas. Os tubos foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e após $48 \pm 2\text{h}$, realizou-se a leitura, considerando-se tubos positivos aqueles em que se apresentava turvação e em que pelo menos 10% do tubo de Durham indicasse a presença de gás. Através do número de tubos positivos e a respetiva diluição foi calculado o número mais provável (NMP) de organismos por grama de amostra (ISO 4831:2006).

2.5 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de probabilidade com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA CARNE

3.1.1 HUMIDADE E CINZAS

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) a percentagem de água na carne de frango é cerca de 75%. Os resultados experimentais obtidos para as carnes embaladas em filmes com diferentes concentrações de extrato de alecrim (Figura 3.1), encontram-se muito próximos do valor padrão.

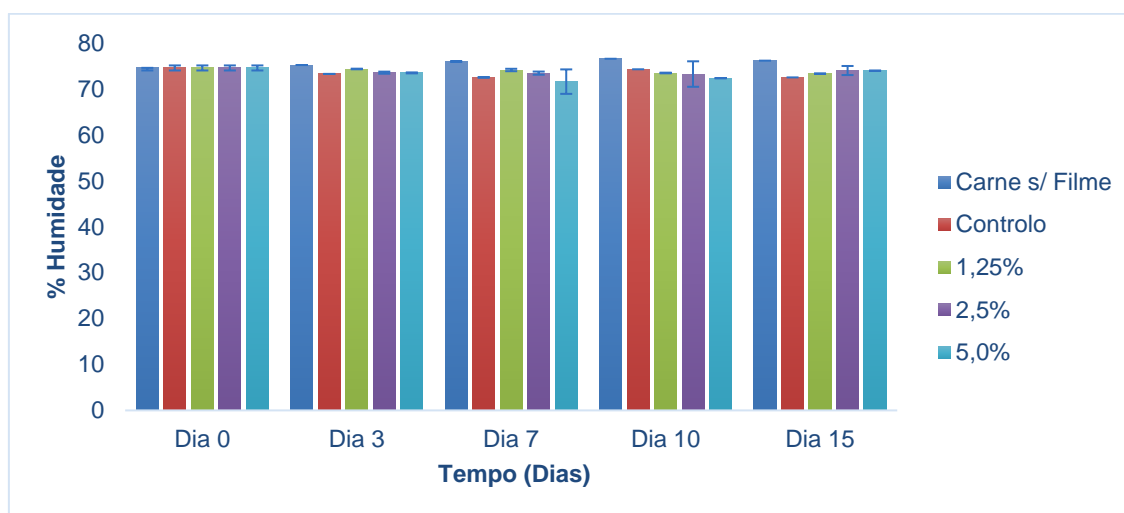


Figura 3.1-Resultados obtidos para humidade da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%-controlo, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Ao analisar os resultados das carnes embaladas (com MMT), verifica-se que a carne sem biofilme apresentou um aumento na humidade ao longo do tempo e o controlo uma diminuição ao fim de 15 dias. No dia 3 a carne de frango envolvida em biofilmes com 1,25% de EHA apresentou um teor de 74,37%, valor semelhante quando comparado ao controlo do dia 0 que obteve 74,59%. Porém, no dia 7 a carne apresentou uma humidade mais baixa (71,6%) nas amostras embaladas com a incorporação de 5,0% de EHA, no entanto, ao fim de 15 dias foi mais elevado (73,99%) quando comparado ao controlo (72,54%). A análise estatística efectuada (Tabela A.1, em anexo), identificou que as variações observadas tiveram significado ao longo do tempo ($P < 0,05$), mas apenas nas carnes envoltas com filme. Todas as carnes envoltas com biofilmes, durante o tempo de armazenamento, apresentaram uma humidade inferior à da carne sem filme. A humidade apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao tipo de biofilme o que explica as variações ocorrida (Tabela A.1, em anexo).

Desta forma, considera-se haver uma tendência para a diminuição da humidade na carne com biofilmes de quitosano e extrato de alecrim. Devido à hidrofiliabilidade do

quitosano, este pode ter absorvido água da carne. Sendo assim, verifica-se uma redução na humidade entre o dia 0 a 15 dias ($p<0,05$) (Tabela A.1). A utilização de biofilmes na embalagem da carne melhora, portanto, as propriedades de barreiras à humidade (Moradi et al., 2012), uma vez que ao absorverem água, reduzem o a_w da água, minorando a possibilidade de proliferação microbiana, tal como referido por Zivanovic & Draughon (2005).

A seguir analisam-se os resultados para a carne envolta com biofilmes sem MMT (Figura 3.2). Da imagem é possível verificar que também ocorreram pequenas variações na humidade ao longo do tempo, mas com significado apenas para as carnes embaladas ($p<0,05$), em que se verificou uma tendência para a redução da humidade. A carne sem filme apresentou sempre valores de humidade superiores aos das carnes com biofilmes. Tal como verificado nos filmes com MMT, os biofilmes absorveram alguma da água da carne, tendo por isso apresentado resultados de humidade inferiores aos da carne sem filme (diferenças estatisticamente significativas, $p<0,05$). Não se verificaram diferenças entre filmes devido à incorporação de EHA e devido à incorporação de MMT.

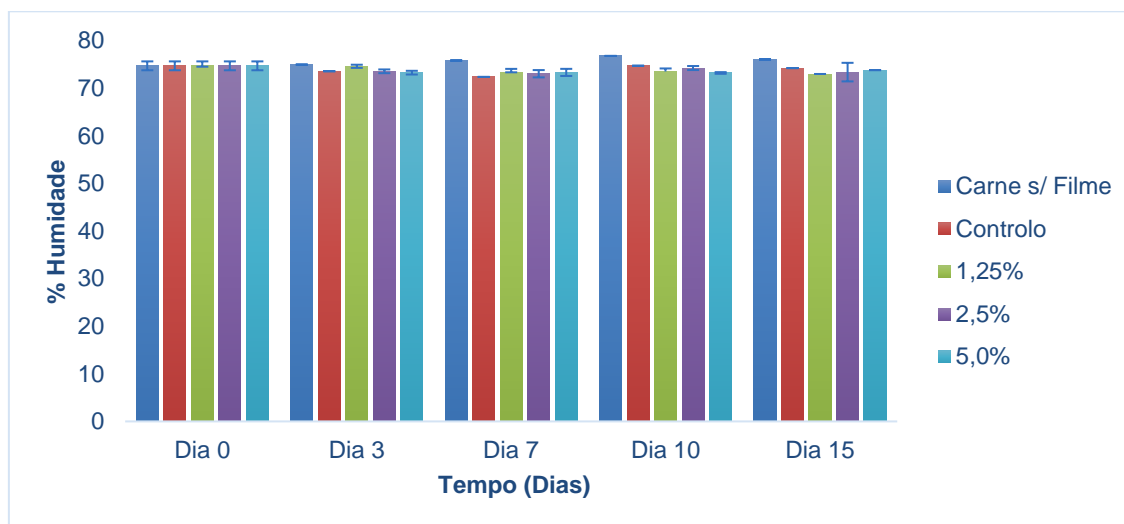


Figura 3.2- Resultados obtidos para humidade da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.

Portanto verifica-se que os biofilmes diminuem a humidade da carne, sendo os filmes com menores teores de extrato de alecrim tendencialmente mais hidrofílicos que os com mais extrato e o controlo, uma vez que as carnes embaladas nos biofilmes com 1,25% de EHA apresentaram menor conteúdo de humidade, seguida por biofilmes incorporados com 2,5% e 5% de EHA, controlo e sem filme (embora as diferenças entre filmes não tivesse sido estatisticamente significativa, a diferença significativa foi observada entre carne sem filme e embalada com filmes). As amostras envolvidas nos

biofilmes com MMT, em comparação com os biofilmes sem MMT, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), ao longo do tempo de armazenamento (Tabela A.1, em anexo).

Para além da humidade, apresentam-se os resultados obtidos relativamente ao teor em cinzas da carne (Figura 3.3 e 3.4). De acordo com a FAO, o valor médio para o teor em cinzas é de 1,2%, e, portanto, os valores obtidos experimentalmente (1,0-1,6%) encontram-se, na maioria, dentro deste padrão.

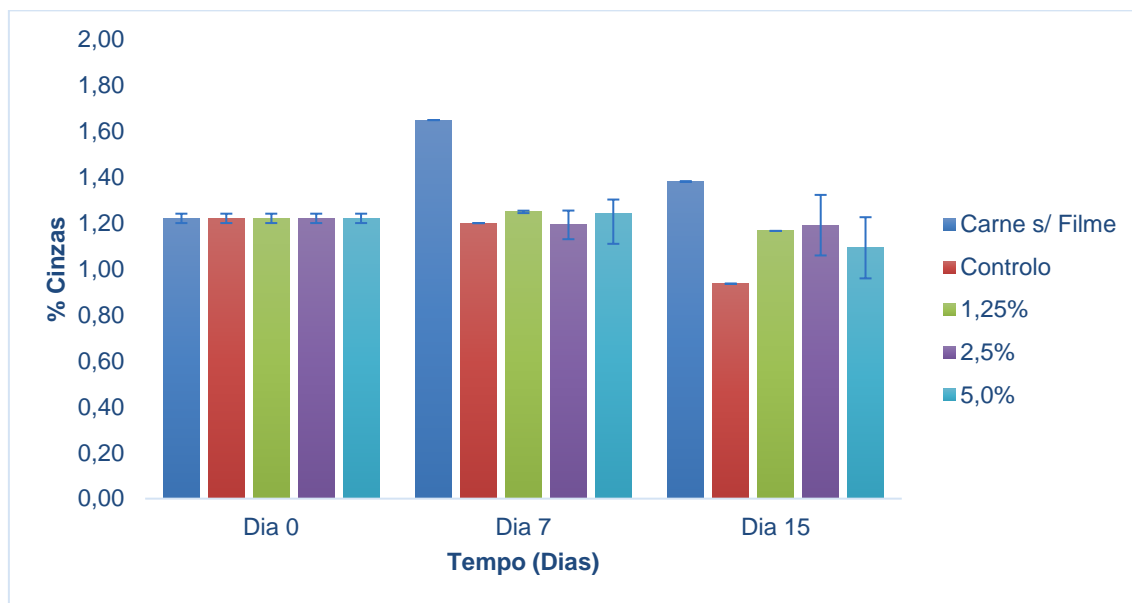


Figura 3.3- Resultados obtidos para cinzas da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para as carnes embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

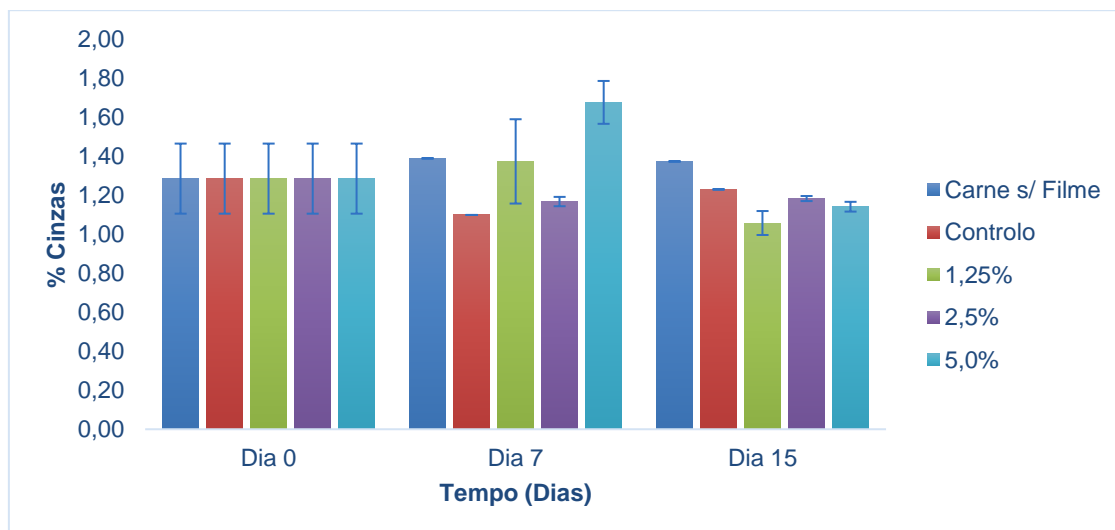


Figura 3.4- Resultados obtidos para cinzas da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para as carnes embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.

Quer na carne envolta em filmes, quer na carne sem filme, a variação ao longo do tempo não foi significativa ($p < 0,05$). Não se verificaram, igualmente diferenças no teor de cinzas da carne envolta em filmes e sem filme. A incorporação de extractos não resultou em carnes com teores de cinzas superiores, indicando que não houve migração de matéria mineral dos óleos para as carnes envoltas.

Através dos resultados obtidos ao fim de 15 dias (Tabela 3.1), pode-se observar que as cinzas variaram de 0,9% a 1,2% para as carnes embaladas com biofilmes com MMT incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim e 1,1% a 1,2% para as carnes envolvidas com biofilmes sem MMT. Verifica-se, portanto, que a nanoargila montmorilonite (MMT) não influenciou os resultados de cinzas. Não houve migração do MMT para a carne embalada, visto que o teor de cinzas não aumentou. Trata-se de um ponto positivo, pois demonstra a não eventual exposição do consumidor devido à ingestão de um alimento acondicionado neste tipo de material (considerando a composição mineral da nanoargila que poderia migrar para o alimento). Há no entanto, uma tendência de teores em cinzas mais reduzidos nas carnes embaladas com os filmes de quitosano (embora sem significado estatístico). Esta redução em cinza da carne pode ser explicada pela adsorção de água pelos filmes e dos solutos nela dissolvidos.

Tabela 3.1- Parâmetro de cinzas da carne de frango com biofilmes e montmorilonite (MMT).

Parâmetro	Composição de extrato de alecrim (%)	Quitosano+MMT ¹	Quitosano ²
Cinzas (%) T15	0	0,9± 0,0	1,2± 0,0
	1,25	1,2± 0,0	1,1±0,1
	2,5	1,2± 0,1	1,2±0,0
	5,0	1,1± 0,1	1,1±0,0

Resultados do dia 15 representam a média das repetições ± desvio padrão. Valor obtido para carnes embaladas nos biofilmes com MMT¹ e valores obtidos para carnes embaladas nos biofilmes sem MMT².

3.1.2 PH E ACIDEZ

Os valores de pH para carne de frango são influenciados por vários fatores (raça, sexo, transporte, stress antes do abate, método de abate, tempo de armazenamento da carne, entre outros), podendo estar entre 5,2 e 7,0 (Glamoclija et al., 2015). No trabalho experimental, os valores obtidos (Figura 3.5 e 3.6) estão, na maioria, dentro deste padrão.

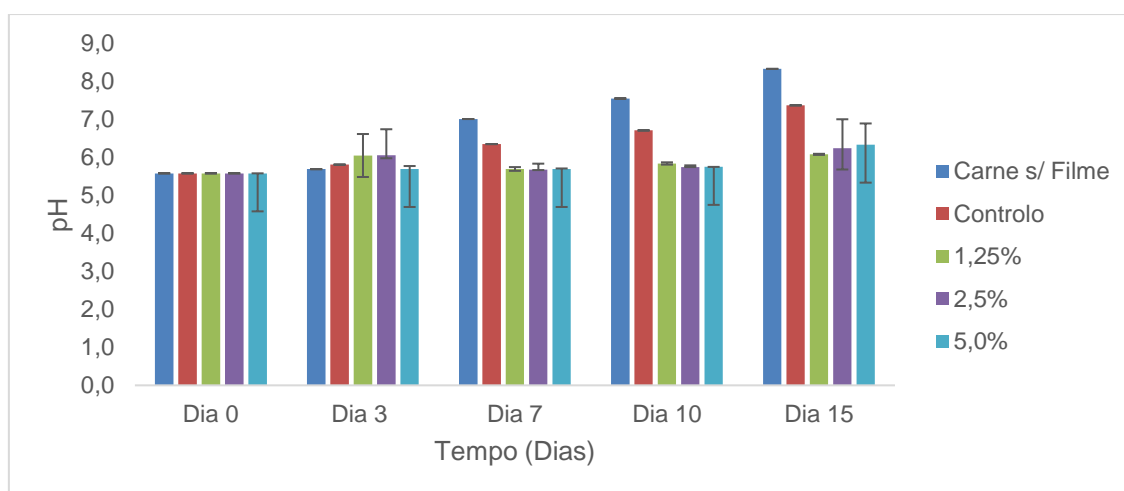


Figura 3.5- Resultados obtidos para o pH da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para as carnes embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

O pH ao longo do tempo foi aumentando ($p > 0.05$, Anexo I), devido à proliferação de microrganismos, principalmente nas amostras envoltas no filme controle ou sem qualquer proteção dos biofilmes. Os microrganismos ao degradarem as proteínas, produzem aminas e amoníaco, neutralizando os ácidos.

Apesar do pH ter variado para ambos, o grupo controle (7,4) é inferior ao da carne sem filme (8,3) e, portanto, pode-se observar que a carne envolvida nos biofilmes de quitosano com MMT tem, por si só, propriedades químicas, que ajudam na preservação e manutenção do pH do alimento (Baston et al., 2008), ou que fazem com que o seu aumento ao longo do tempo não seja tão significativo.

Os compostos fenólicos do extrato de alecrim utilizados nos biofilmes com quitosano e MMT melhoram as propriedades do biofilme (Baletine et al., 2006) ($p > 0,05$, Anexo I). Pode-se verificar através dos resultados analisados que como não houve grandes variações nos grupos com extrato (1,25%; 2,5%; 5%) ao longo do tempo, o alecrim ajudou a manter o pH estável. No entanto, um pH muito baixo pode causar a oxidação da mioglobina e alterar a cor do produto, o que não é conveniente (Santos & Oliveira, 2012). Neste caso, o pH das carnes envoltas com filmes incorporados com EHA não diminuiu em relação aos valores iniciais.

Sendo assim, já que o pH mais alto favorece o crescimento de microrganismos, os resultados indicam que a incorporação dos extratos nos filmes pode ajudar a controlar o pH e a mantê-lo sem variações face ao pH inicial, o que pode ajudar a controlar a proliferação de microrganismos (Mohamed & Mansour, 2012).

Para os resultados obtidos com os filmes sem MMT (Fig 3.6), verifica-se que estes também obtiveram comportamento semelhante aos resultados com MMT (Fig

3.5), e verifica-se que a incorporação do MMT nos filmes de quitosano não influenciou o pH das carnes embaladas nos biofilmes produzidos ($p < 0,05$, Anexo I).

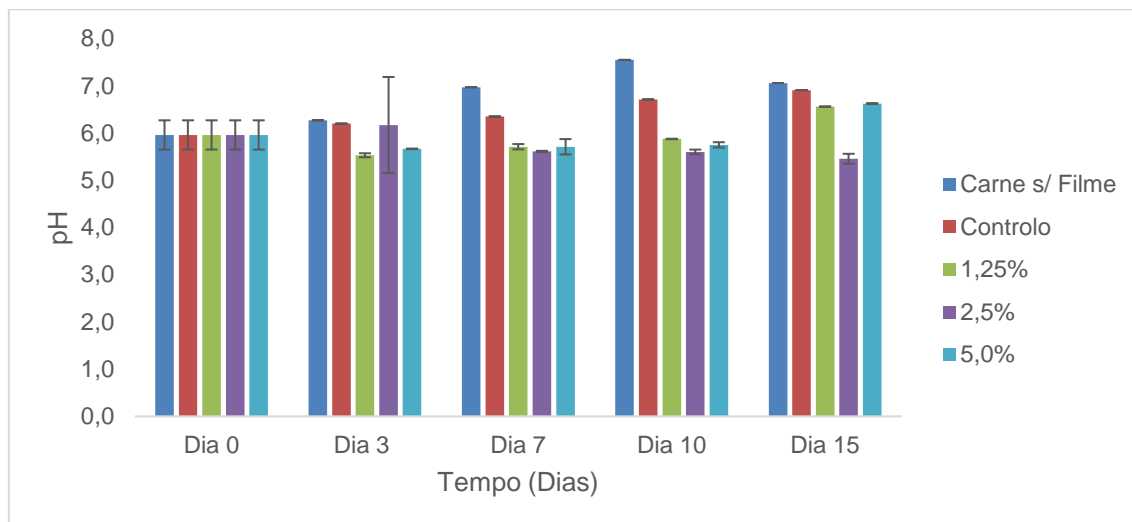


Figura 3.6- Resultados obtidos para pH da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.

Como podemos verificar (Tabela 3.2) os valores de pH apresentam-se mais baixos ao fim de 15 dias tanto para a carne de frango envolvida nos biofilmes com MMT, como para as sem MMT, mas com EHA, que variaram em média de 5,5 a 6,6 em geral, por comparação com os controlos sem EHA. Nestes filmes com EHA, todos os valores se encontram entre 5,0 a 7,0 considerado o pH normal para a carne de frango (Glamoclija et al., 2015).

Tabela 3.2-Parâmetro de pH da carne de frango com biofilmes e montimorilonite (MMT).

<i>Parâmetro</i>	<i>Composição de extrato de alecrim (%)</i>	<i>Quitosano+MMT¹</i>	<i>Quitosano²</i>
<i>pH (T15)</i>	0	7,4±0,0	6,9±0,0
	1,25	6,1± 0,0	6,6±0,0
	2,5	6,2± 0,8	5,5±0,1
	5,0	6,3± 0,6	6,6±0,0

Resultados do dia 15 representam a média das repetições \pm desvio padrão. Valor obtido para a carne embalada nos biofilmes com MMT¹ e valores obtidos para a carne embalada nos biofilmes sem MMT².

Os valores da carne sem filme e o grupo controlo foram aumentando ao longo tempo, o que pode indicar que a carga microbiana poderá também aumentar, pois esta é menos sensível a pH's neutros. Considerando o pH um indicador de qualidade, observa-se que as carnes embaladas nos biofilmes de extrato de alecrim para ambos os resultados (Figura 3.5 e 3.6), mantiveram um pH mais baixo, tendo uma menor probabilidade de proliferação de microrganismos (Glamoclija et al., 2015).

Com referência à acidez nas carnes envolvidas em biofilmes com MMT (Figura 3.7) as diferenças entre amostras estão mais evidentes e corroboram com o pH ($p<0,05$, Anexo I). Nota-se que ao longo do tempo tanto a acidez da carne sem filme, como a carne do grupo controlo diminuiu (tendo havido aumento de pH), pelas razões apresentadas em relação às alterações de pH. Pelo contrário, nos grupos de carne embaladas nos filmes com diferentes concentrações de EHA, a acidez aumentou, tal como relatado por Imeri et al. (1988), devido aos ácidos livres presentes nos extractos, e que se libertaram para a carne. A alteração de acidez ao longo do tempo, nas carnes, é significativa ($p<0,05$, Anexo I)

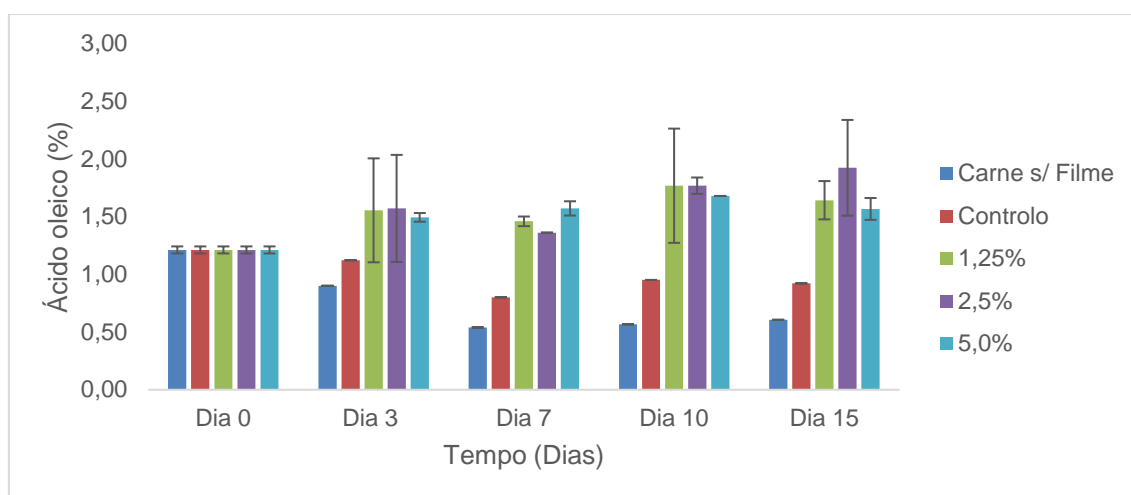


Figura 3.7- Resultados obtidos para acidez da carne, expressos em ácido oleico. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Os resultados da acidez das carnes embaladas sem a incorporação de MMT nos biofilmes foram semelhantes (Figura 3.8). Não se verificaram diferenças significativas devido à incorporação de MMT ($p > 0,05$, Anexo I). Segundo os resultados estatísticos o tipo de filme mostrou-se significativo ($p < 0,05$) (Tabela A.1, Anexo I), ou seja, a carne sem filme e a carne envolvida nos filmes controle apresentaram menor acidez do que as carnes envolvidas com filmes incorporados com EHA. Houve variação significativa da acidez ao longo do tempo ($p < 0,05$, Anexo I), porém a argila não teve efeito significativo ($p > 0,05$, Anexo I) nos resultados.

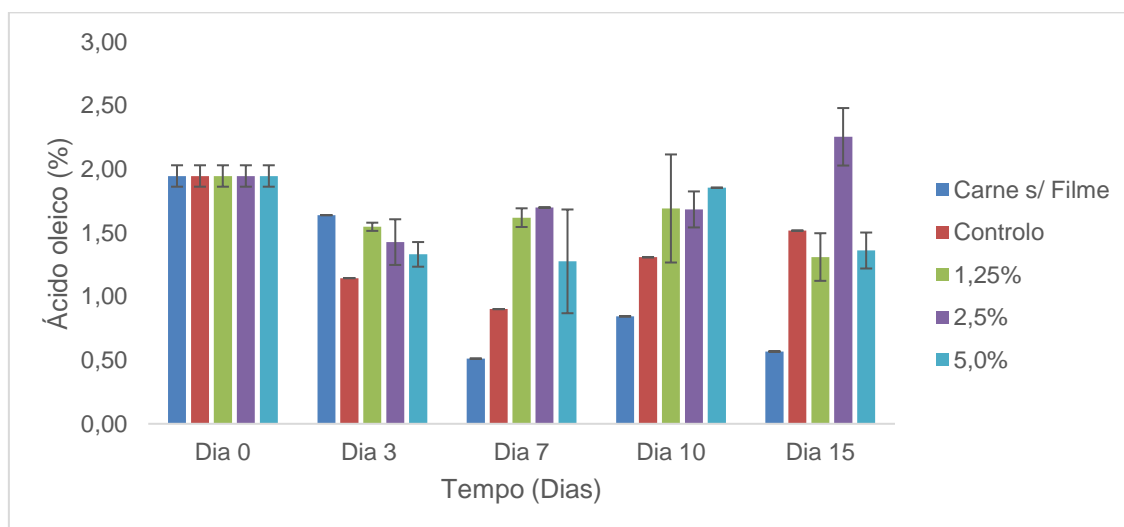


Figura 3.8- Resultados obtidos para acidez da carne, expressos em ácido oleico. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.

3.1.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA (ENSAIOS DE TBARS)

A oxidação lipídica pode ser determinada através de compostos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O principal produto resultante da oxidação é o malondialdeído (MDA), que pode ser um iniciador carcinogénico e mutagénico, podendo afetar a segurança do consumo de carne. Uma vez que o MDA pode ser um produto secundário da oxidação, quanto maior a sua concentração, maior será o grau de oxidação da carne (Fernández et al., 1997, Osawa et al., 2005).

A carne de frango apresenta problemas de conservação devido a sua alta concentração em ácidos gordos polinsaturados, principalmente em carnes mais escuras que contém maior teor de ferro e fosfolípidos (Borba et al., 2012).

Os resultados (Figura 3.9) mostram que houve um aumento significativo ao longo do tempo de substâncias que reagem com o TBA ($p < 0.05$, Anexo I). No tempo prolongado de armazenamento, segundo Ozkececi et al. (2008), ocorre a oxidação de gorduras por acção de factores como o oxigénio, a luz, a temperatura, entre outros. Por exemplo, os valores de TBA foram superiores em carnes armazenadas com a presença de ar em relação aquelas embaladas à vácuo (Ozkececi et al., 2008).

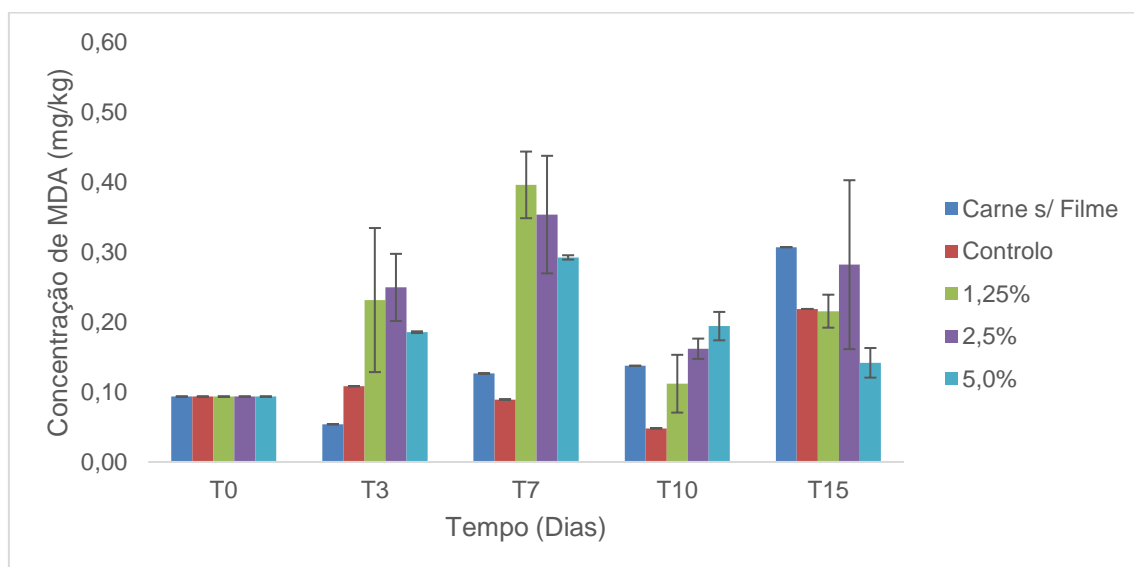


Figura 3.9- Resultados obtidos para TBA da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

As carnes sem biofilmes tiveram um aumento da concentração de MDA ao longo do tempo, como já era esperado. Para o grupo controlo pode-se considerar que o filme, sem qualquer adição de extratos, tem propriedades antioxidantes, uma vez que a partir dos 7 dias a concentração de MDA é menor do que sem filme, ou seja, obteve-se uma

concentração de MDA inferior, sendo que o filme com quitosano é de fato uma barreira ao oxigênio, limitando a oxidação da carne (Vargas et al., 2009).

Seria de esperar que a carne protegida com filmes incorporados com EHA tivesse uma menor concentração de MDA comparativamente ao controle e à carne sem filme, uma vez que o alecrim tem compostos fenólicos que evitam a oxidação, assim como demonstrado por Siripatrawan & Noipha (2012) relativamente ao extrato de chá verde para amostras de carne de porco. De fato, os polifenóis estão descritos como compostos que inibem a iniciação da cadeia de radicais e interagem com radicais livres para inibir a oxidação lipídica. No entanto, como mostrado por Wada et al. (2011), o extrato de alecrim possui ácido rosmarínico que pode levar a um aumento de MDA e outros componentes, ainda que não se tenha estudado ao certo os seus mecanismos de atuação para este efeito. No nosso estudo, verificou-se que a aplicação de EHA não teve efeito na redução da oxidação lipídica face ao quitosano com MMT. Mas a carne embalada apresentou menor oxidação do que a carne sem filme ($p < 0,05$, Anexo I), 15 dias após o início do estudo.

Nas carnes embaladas com biofilmes sem MMT (Figura 3.10), pode-se observar que há um aumento de MDA ao longo do tempo, tal como observado nos filmes com MMT. No entanto, nestes filmes, não se observaram diferenças na concentração de MDA entre carnes embaladas e sem estarem embaladas. Não se verificam, também, efeitos na redução da oxidação lipídica pela incorporação de EHA.

Os valores obtidos (Figura 3.9 e 3.10) são concordantes com os valores obtidos por Garrido et al. (2011), que verificou em seus estudos que ao adicionar antioxidantes naturais a carne de frango crua estas tiveram sua oxidação retardada obtendo valores de 0,2 e 0,5 mg MDA/kg.

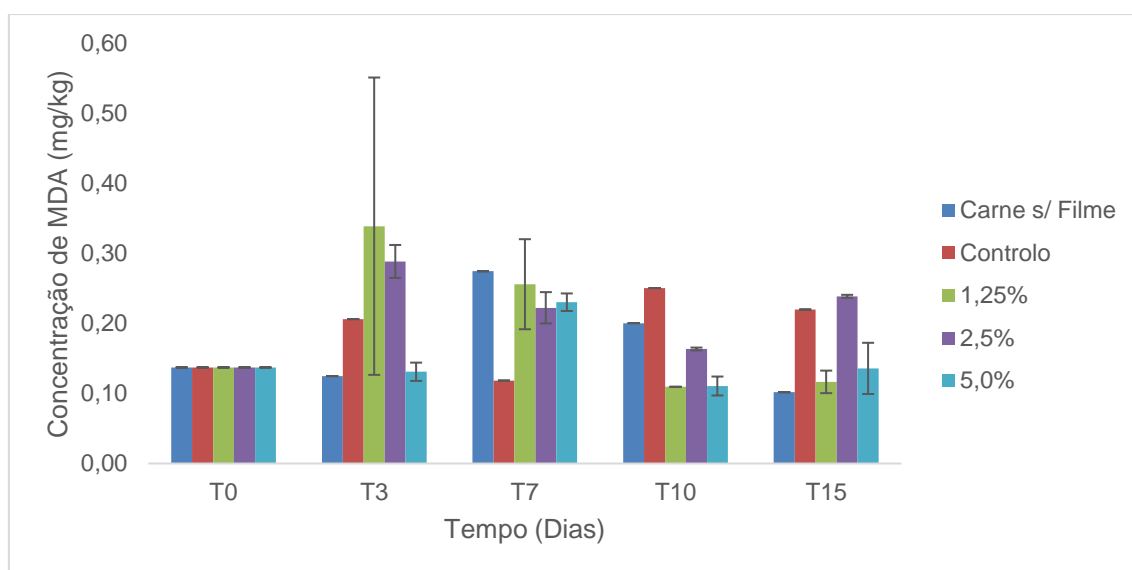


Figura 3.10- Resultados obtidos para TBA da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), sem MMT.

Através dos resultados obtidos (Tabela 3.3) para o índice de TBA da carne de frango embalada em biofilmes com e sem MMT, verifica-se ao fim de 15 dias, que para as carnes com biofilmes de EHA, as que tiveram mais baixos índice de TBA foram as amostras envolvidas em biofilmes com MMT a 5,0% de extrato de alecrim e para as que foram embaladas nos biofilmes sem MMT 1,25% e 5,0% de extrato de alecrim. No entanto, verifica-se que a adição de MMT não teve efeitos significativos na redução da oxidação lipídica ($p > 0.05$, Anexo I), embora no ensaio em que se utilizaram filmes com MMT se tivesse verificado uma menor oxidação face à carne sem filme (Figura 3.9). Ao fim de 15 dias, verifica-se que os resultados em geral foram reduzidos, mesmo na carne sem filme.

Tabela 3.3- Índice de TBA da carne de frango com biofilmes e montimorilonite (MMT).

Parâmetro	Composição de extrato de alecrim (%)	Quitosano+MMT ¹	Quitosano ²
TBA (mg/kg) (T15)	0	0,22± 0,00	0,22± 0,00
	1,25	0,22± 0,02	0,12± 0,02
	2,5	0,28± 0,12	0,24± 0,00
	5,0	0,14± 0,02	0,14± 0,04

Resultados do dia 15 representam a média das repetições ± desvio padrão. Valor obtido para a carne embalada nos biofilmes com MMT¹ e valores obtidos para a carne embalada nos biofilmes sem MMT².

Balentine et al. (2006) em seus estudos com o extrato de alecrim em carne bovina picada, verificou baixos valores de índice de TBA. Sendo que para o controle (sem a adição de extrato de alecrim) obteve um valor de 3,75 mg/kg, bem mais elevado do que nas amostras com extracto de alecrim.

De modo semelhante, Bazargani-Gilani et al. (2015) observou baixos valores de índice de TBA para a carne de frango, porém utilizou diferentes tratamentos com sumo de romã e quitosano. De forma geral verificou que para todos os tratamentos os resultados foram abaixo de 0,5 mg de MDA/kg não apresentando rancidez oxidativa durante o período de armazenamento (0 a 20 dias).

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, foram significativos, uma vez que as carnes que foram envolvidas nos biofilmes se mostraram com índice baixo de oxidação, quando comparado com outros autores.

Observa-se que as amostras embaladas nos biofilmes com MMT e sem MMT não alcançaram valores acima de 2 mg de malonaldeído/Kg de carne, que é o valor considerado como limite para aceitação em termos de oxidação lipídica (Backes et al., 2013).

3.1.4 COR

A cor da carne *in natura* é uma característica que os consumidores verificam, influenciando no momento da compra. Os pigmentos mioglobina e hemoglobina, são proteínas associadas ao ferro que em contato com o oxigênio pode alterar a cor da carne (Venturini et al., 2007).

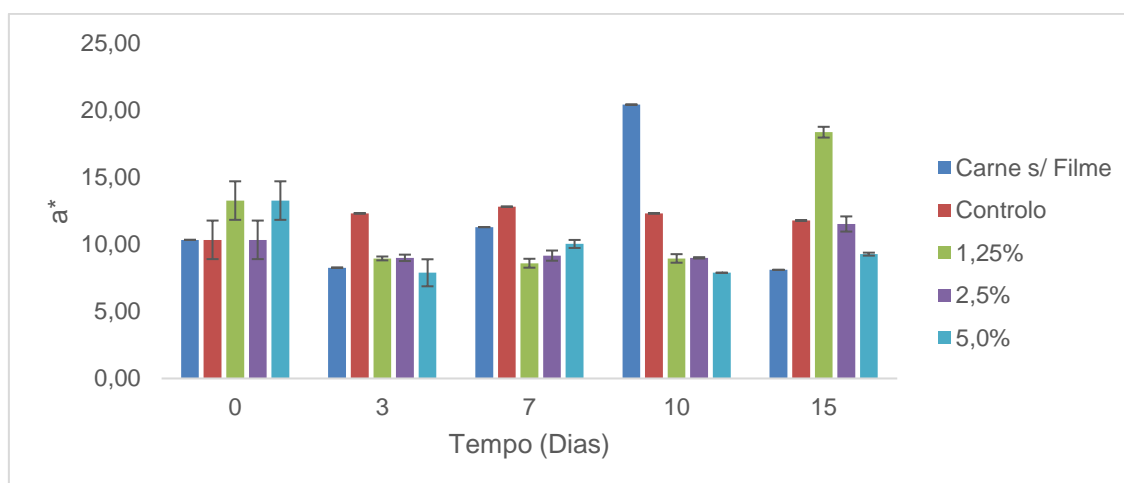


Figura 3.11- Resultados obtidos para parâmetro a^* da carne. Ensaio realizado para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

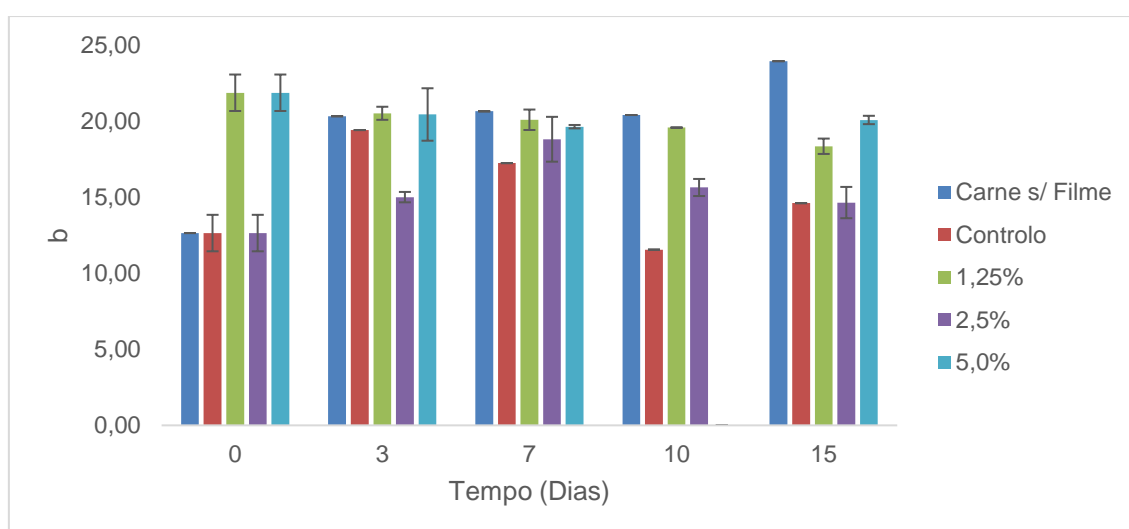


Figura 3.12- Resultados obtidos para parâmetro b^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).

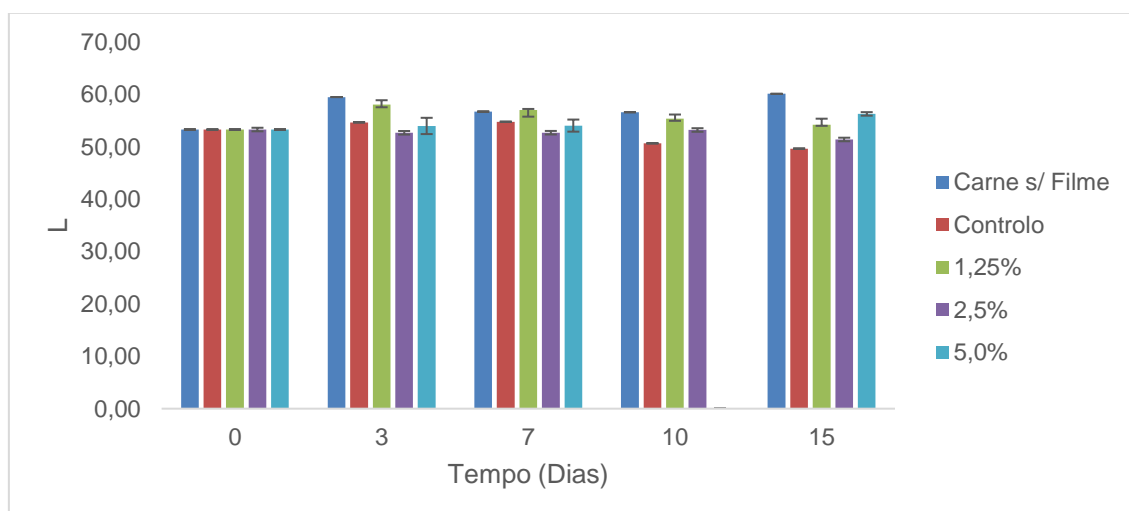


Figura 3.13. Resultados obtidos para parâmetro L da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%,1,25%; 2,5%; 5,0%).

Assim para analisar a cor foi usada uma escala de cores. O parâmetro L (Figura 3.13), pode ir de $L=0$ (preto) até $L=100$ (branco), indica a luminosidade e/ou brilho, e quanto menor for mais escura será a amostra. Os parâmetros a^* (Figura 3.11) e b^* (Figura 3.12) podem ir de valores negativos a positivos, sendo que a escala de cores para a^* é de verde ($-a^*$) a vermelho ($+a^*$), e para b^* é de azul ($-b^*$) a amarelo ($+b^*$). O conjunto destes parâmetros dá-nos a cor real da carne (Leceta e Dela Caba 2013; Schinella et al., 2000)

A análise dos resultados (Figura 3.13) permite observar que houve uma variação na luminosidade (valor de L) da carne sem filme ao longo do tempo ($p<0,05$), mas não das carnes embaladas em filmes. Observa-se que o valor de L para a carne sem filme

aumentou mais do que para o controlo e filmes com extratos de alecrim, de forma significativa ($p<0,05$). Verifica-se que ao fim de 15 dias, a carne embalada sem a incorporação de EHA (controlo) apresentou menor luminosidade em comparação com as que foram embaladas em biofilmes com a adição de extrato de alecrim, e com valores inferiores aos do tempo 0. Milani et al. (2010), nos seus estudos também observaram uma redução no valor L, caracterizado por uma carne mais “escura” e menos luminosa.

Para o valor de a^* as amostras apresentaram variações ao longo do tempo, embora no início com uma tendência de redução e ao fim de 15 dias com uma tendência para o aumento. Verifica-se que o extrato de alecrim pode ter uma leve interferência na cor da carne deixando-a um pouco mais verde ($p<0,05$). Esse fato possivelmente se deve ao extrato de alecrim apresentar uma coloração esverdeada.

Em relação aos resultados do parâmetro b^* , verifica-se que este apresentou no dia 0 para a carne embalada em 1,25% e 5,0% de extrato de alecrim valores maiores comparados a carne sem filme, o controlo e as amostras envolvidas nos biofilmes com 2,5% de extrato de alecrim. Já no dia 3 houve o menor valor de b^* foi para carne envolvida no biofilme de 2,5%, no dia 7 permaneceram relativamente próximos entre si no geral e no dia 10 e 15 os valores menores foram para o controlo e a carne embalada no biofilme de 2,5% de extrato de alecrim. A carne sem filme foi a que apresentou maior variação ao longo do tempo juntamente com a carne embalada em filme contendo 5% de extracto de alecrim. Nos estudos de Milani et al. (2010) a carne de frango que foi submetida ao tratamento com extratos (caqui, *Diospyros kaki*, L.), apresentou pequena variação do valor b^* , tal como neste estudo.

Selani et al. (2011), verificou que com a adição de extratos etanólicos de resíduos de uvas em carne de frango crua, não houve diferenças significativas na tonalidade de cor. Assim como, observado por Teruel et al. (2015), em nuggets de frango congelado com a incorporação de extrato de alecrim, devido aos tratamentos com antioxidantes naturais. No nosso estudo também se observou uma ligeira variação na carne com o filme controlo e com 2,5% de extracto.

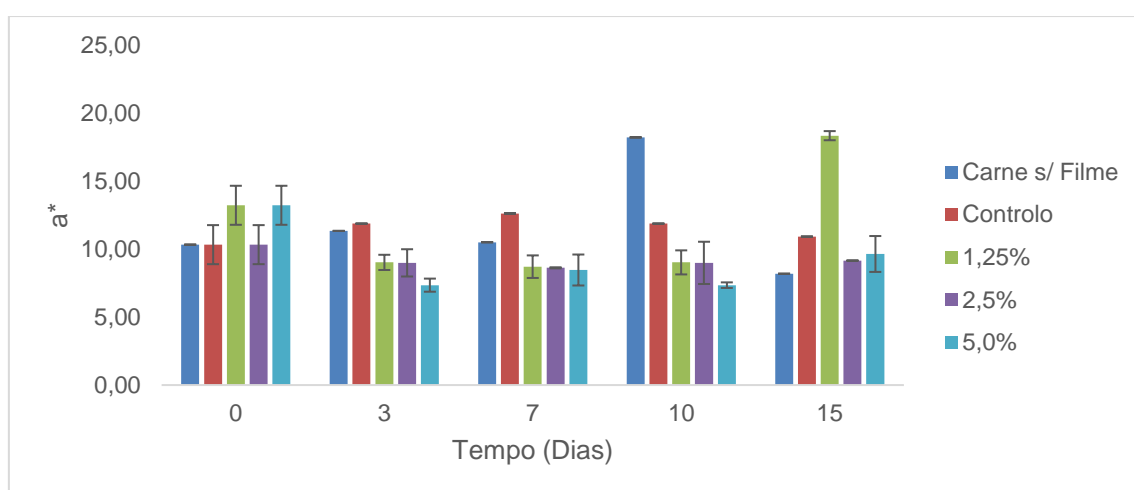


Figura 3.14- Resultados obtidos para parâmetro a^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

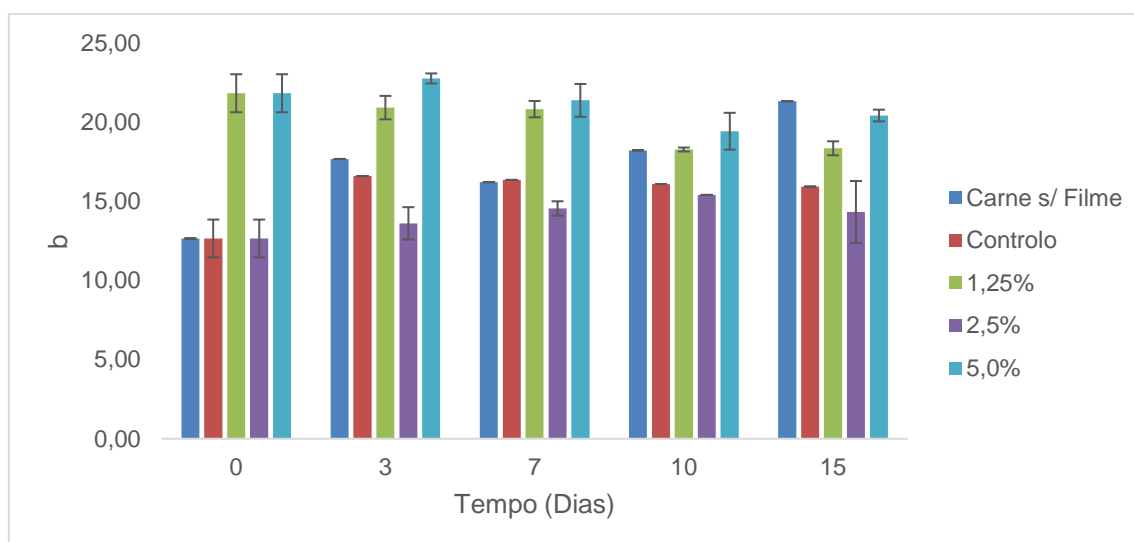


Figura 3.15- Resultados obtidos para parâmetro b^* da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

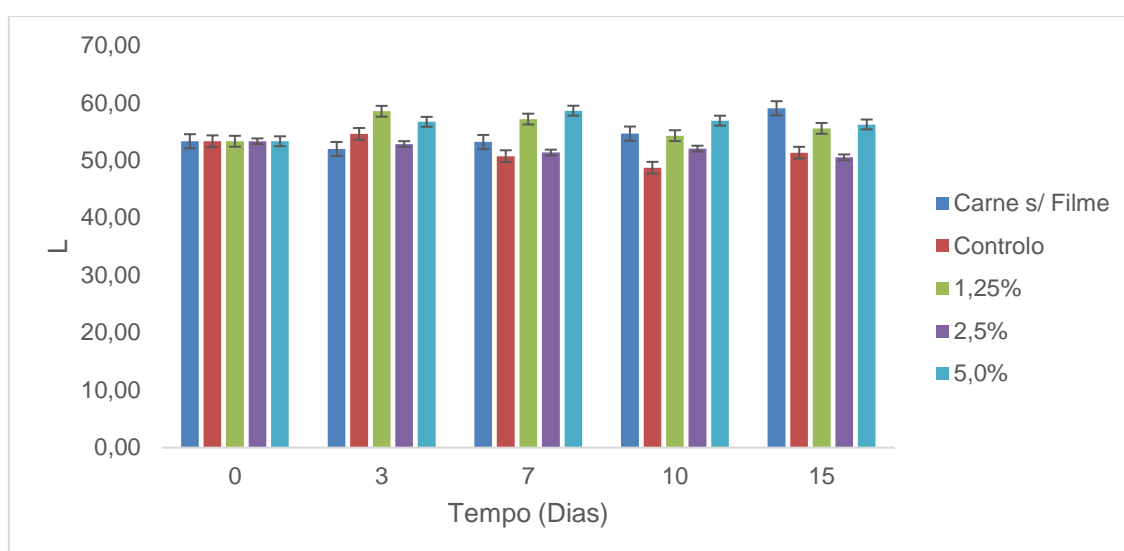


Figura 3.16- Resultados obtidos para parâmetro L da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Ao analisar e comparar os resultados dos seguintes parâmetros L, a^* e b^* das carnes envolvidas com biofilmes com MMT com os resultados obtidos nos filmes sem MMT, nota-se que não há grandes diferenças entre si. Desta forma, pode-se considerar que a incorporação de nanoargila montmorilonite (MMT) nos biofilmes não teve grande influência na tonalidade de cor das amostras de frango.

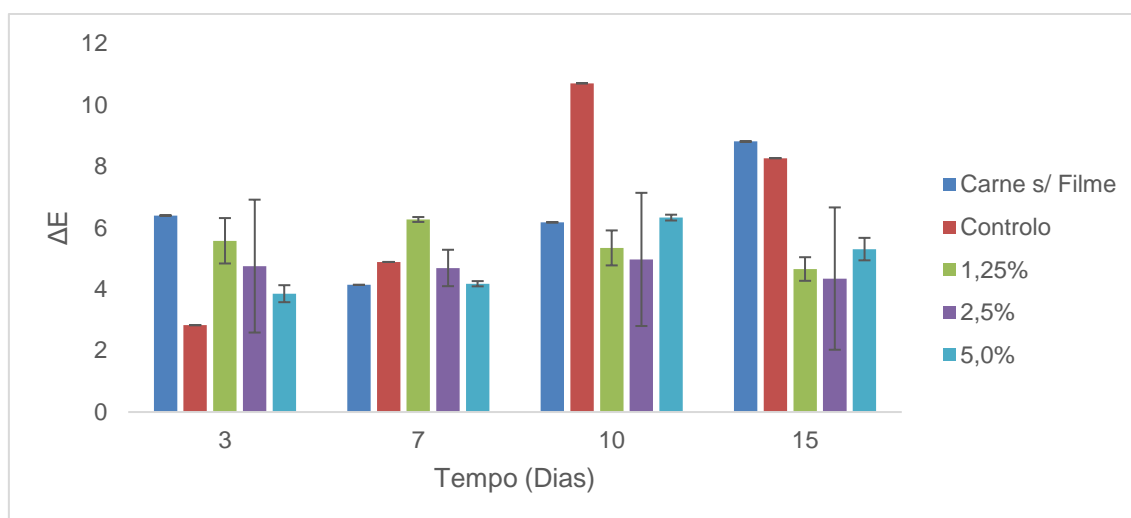


Figura 3.17- Resultados obtidos para variação de cor da carne. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embaladas nos biofilmes incorporado com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

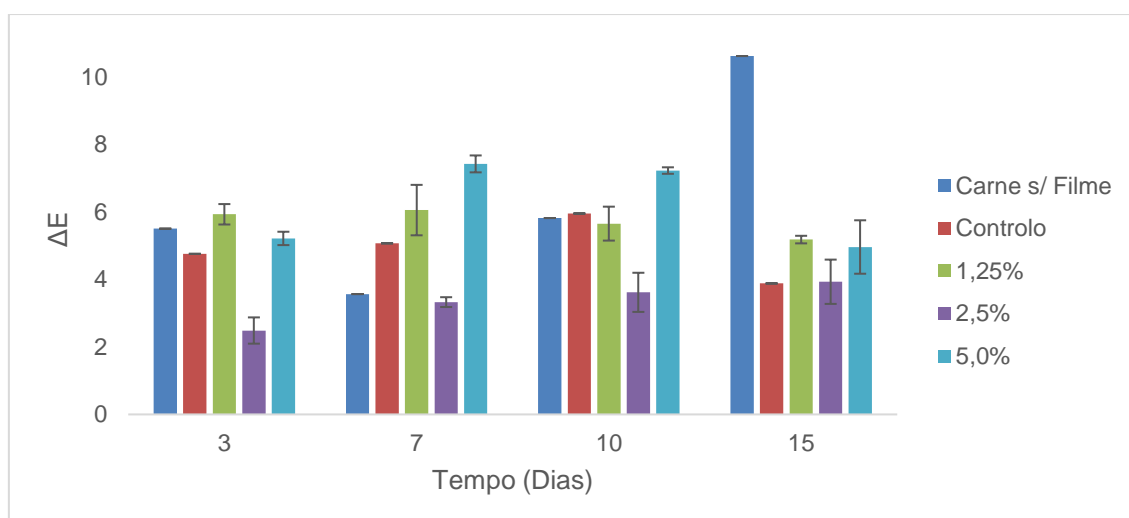


Figura 3.18-Resultados obtidos para a variação da cor. Ensaio realizado para carne sem filme e para carne embaladas nos biofilmes com diferentes concentrações de extrato de alecrim (1,25%; 2,5%; 5%) e grupo controlo, sem MMT.

O ΔE mede a variação total de L, a^* e b^* em relação ao tempo 0. Pela análise dos valores experimentais, são perceptíveis as grandes variações na cor, tanto para os resultados com MMT (Figura 3.17) como para os resultados sem MMT (Figura 3.18), mas nos filmes sem extratos. As amostras embaladas em biofilmes (com MMT) e extractos tiveram pouca variação quando comparada com as carnes sem filme e o controlo, assim como para as amostras envolvidas nos biofilmes sem MMT, sendo que a carne embalada sem MMT com a incorporação de 2,5% de EHA apresentou uma menor variação em comparação às outras amostras. Verifica-se, portanto, que os resultados tiveram menor variação na cor quando as carnes foram embaladas em biofilmes incorporados de EHA (com ou sem MMT).

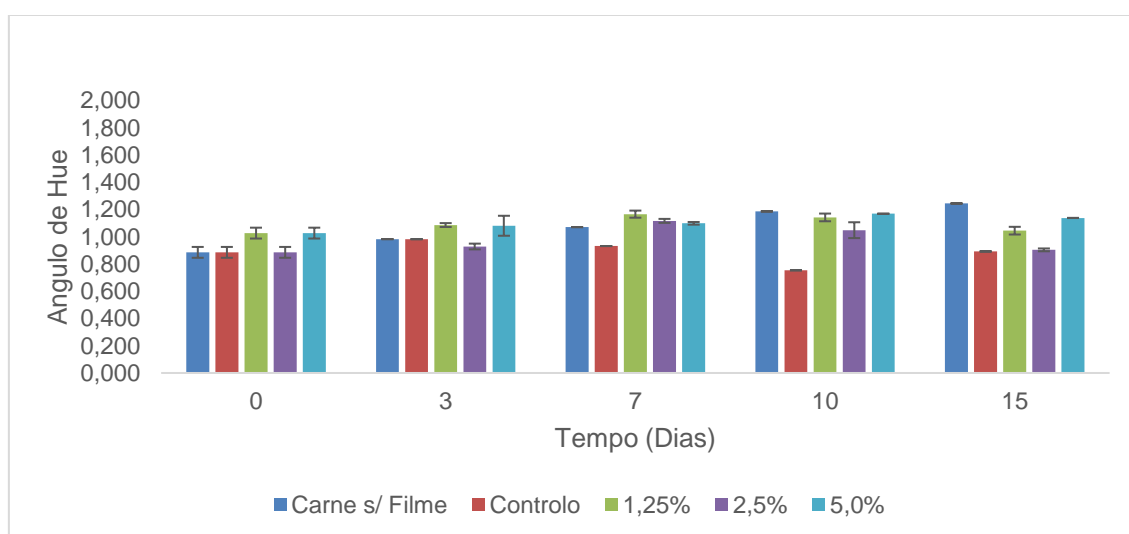


Figura 3.19-Resultados obtidos para o ângulo de Hue. Ensaio realizado para carne sem filme e para carne embaladas nos biofilmes incorporados com MMT e com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

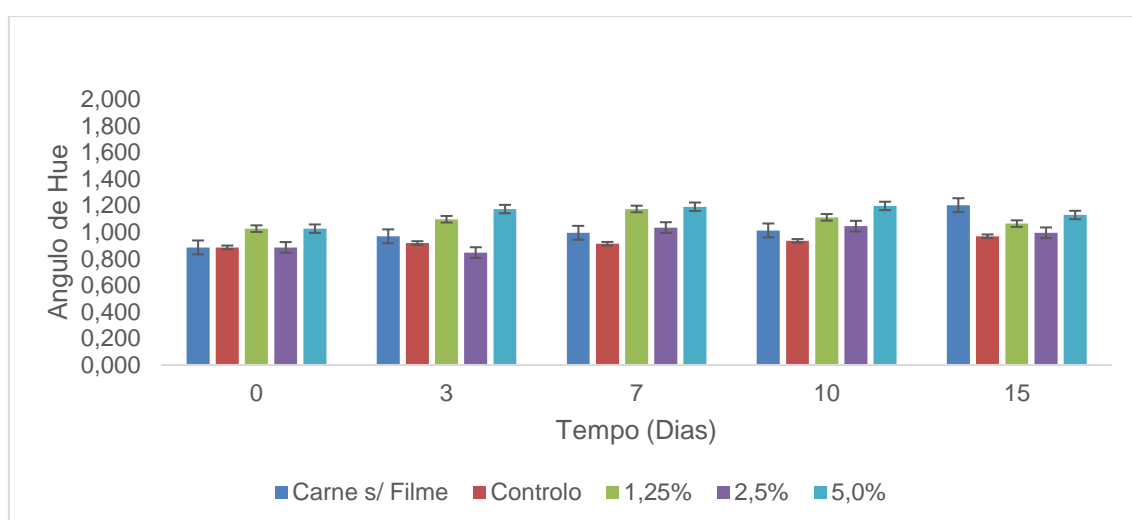


Figura 3.20-Resultados obtidos para o ângulo de Hue. Ensaio realizado para carne sem filme e para carne embaladas nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Quanto menor for o valor do ângulo de Hue mais próximo de uma coloração avermelhada e quanto maior mais próximo do amarelo (Ferreira & Minami, 2000). Portanto, entre os tratamentos com a carne embalada (Figura 3.19 e 3.20) não houve grandes diferenças para o ângulo de Hue, podendo ressaltar que ao fim de 15 dias as carnes que não estavam protegidas com biofilmes apresentaram uma tonalidade menos vermelha em comparação com a condição inicial.

Assim, de acordo com os resultados obtidos para amostras embaladas nos biofilmes com MMT (Figura 3.19) é possível notar que existiu um aumento geral no valor do ângulo de Hue ao longo do tempo, sendo maior para a carne sem filme, apresentando uma tendência para uma cor pouco avermelhada, de semelhante modo o mesmo foi verificado para as carnes embaladas nos biofilmes sem MMT.

Através dos estudos de Balentine et al. (2006) verificou-se que o extrato de alecrim tinha a capacidade de diminuir o ângulo de Hue, assim, considerando os dados deste trabalho, pode-se dizer que os biofilmes com extrato de alecrim interferem na cor quando comparado ao controlo, porém, retardam a oxidação da carne.

A incorporação de nanoargila (MMT) nos biofilmes de quitosano podem estabelecer certa opacidade ao mesmo devido à presença das nanopartículas entre as cadeias poliméricas, consequentemente afectando a transparência do biofilmes em relação às películas sem incorporação de MMT (Nascimento et al. 2013), portanto com uma menor transparência, há uma maior barreira a luz incidente, ou seja, uma maior proteção ao processo oxidativo. Entretanto, esta maior proteção não resultou em grandes diferenças nos parâmetros coliméricos avaliados entre as carnes embaladas

com filmes reforçados com a nanoargila e as acondicionadas na películas sem incorporação do MMT.

3.1.5 MICRORGANISMOS TOTAIS VIÁVEIS (MTV) E COLIFORMES TOTAIS

O crescimento de microrganismos foi analisado em relação aos microrganismos totais viáveis (Figura 3.21 e 3.22). No geral, ao longo do tempo de armazenamento, houve um aumento na contagem dos microrganismos totais viáveis, que foi significativa ($p > 0,05$, Anexo I). Tais resultados corroboram com a evolução do pH das carnes discutidos anteriormente, o aumento no pH favorece o crescimento de microrganismos (Basto et al., 2008). Comparativamente, as carnes sem a proteção dos biofilmes tiveram um desenvolvimento microbiano superior das demais amostras protegidas pelos filmes de quitosano. Esta diferença foi significativa ($p < 0,05$, Anexo I).

As películas ativas, quer contendo MMT (Figura 3.21) quer sem MMT (Figura 3.22) apresentam desta forma atividade antimicrobiana, sendo que a incorporação dos extratos de alecrim potencializam tal bioatividade, visto que com o aumento dos teores de EHA nos biofilmes, menor foi a contaminação encontrada nas carnes.

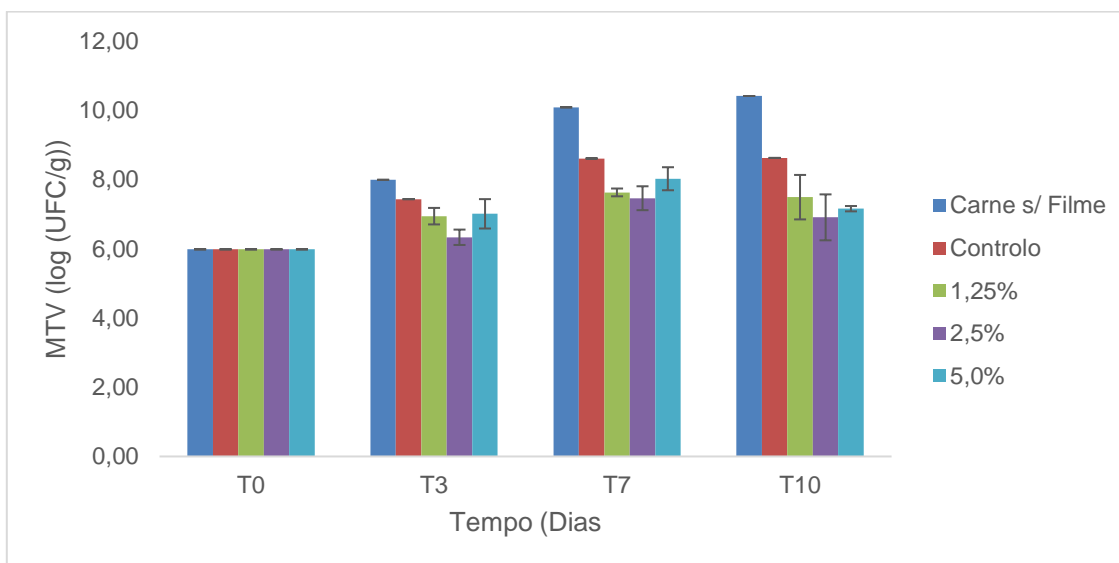


Figura 3.21-Resultados obtidos para a quantidade de microrganismo totais viáveis. Ensaio realizado para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporado com MMT com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Ao comparar os resultados da amostra controlo no dia 10 que foi de 8,62 log UFC/g (Figura 3.21) e para amostras com películas com diferentes concentrações de extrato de alecrim 1,25%; 2,5% e 5,0%, 7,49 log UFC/g, 6,90 log UFC/g e 7,16 log UFC/g respectivamente, verifica-se que ao fim de 10 dias as amostras envolvidas nos

biofilmes com extrato de alecrim mostraram, relativamente ao controlo, um crescimento mais reduzido em média de 1,44 log UFC/g.

Esse efeito também foi verificado nos estudos de Georgantelis et al. (2007), que avaliaram a ação antimicrobiana de extrato de alecrim e quitosano em amostras de salsichas de porco, tendo verificado que após 10 dias de armazenamento, a contagem de microrganismos mesófilos foi menor em até 2,1 log UFC/g quando comparado ao controlo. Os estudos de Georgantelis et al. (2007), verificaram que as amostras com alecrim e quitosano apresentaram efeito sinérgico. No estudo de Sagoo et al. (2002), no tratamento com o quitosano observou-se um aumento da vida de prateleira das salsichas cruas armazenados a temperaturas refrigeradas de 7 a 15 dias. Darmadji e Izumoto (1994), também observaram que o quitosano preserva a carne picada em concentrações de 0,01%.

Nos estudos realizados por Siripatrawan e Noipha (2012), verificou-se que o quitosano poderia inibir a atividade microbiana nas salsichas de porco e que a incorporação de extrato de chá verde aos filmes melhoraram suas propriedades antimicrobianas. Os resultados obtidos no nosso ensaio vão ao encontro dos resultados da literatura, tendo-se verificado que as propriedades do alecrim melhoraram as propriedades antimicrobianas dos biofilmes com quitosano (Figura 3.21 e 3.22).

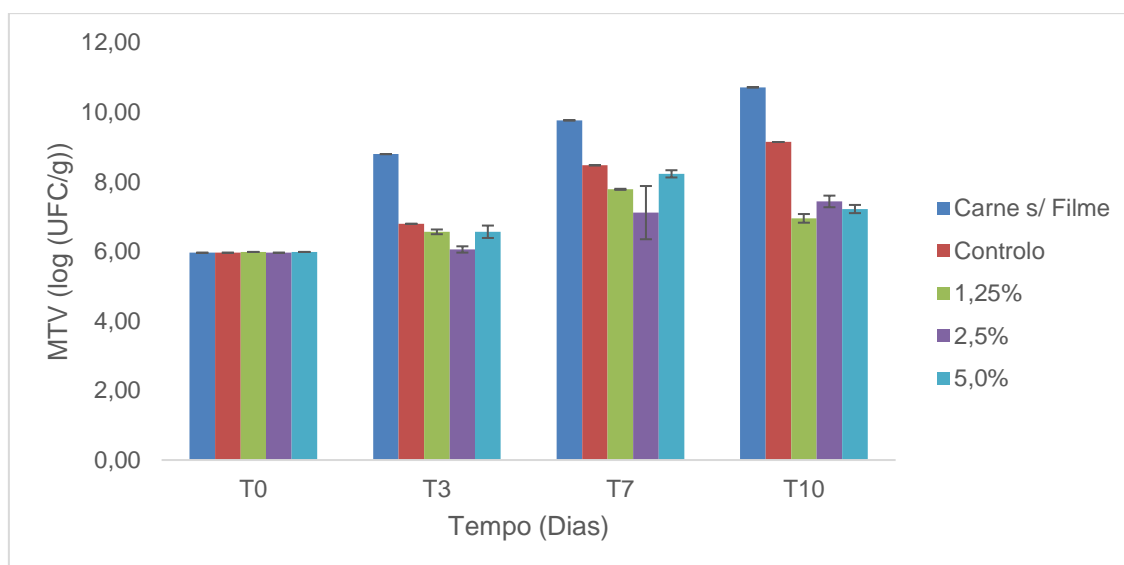


Figura 3.22-Resultados obtidos para a quantidade de microrganismo totais viáveis. Ensaio realizado para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.

Os resultados das amostras que foram envolvidas em películas sem a incorporação de MMT, foram semelhantes aos resultados com MMT. Ou seja, as amostras com biofilmes e extrato de alecrim mostraram uma tendência para a redução da contagem microbiana quando comparadas com as amostras sem filme e controlo.

Verificou-se que a adição de argila (MMT) não influenciou o efeito antimicrobiano dos biofilmes ($p>0,05$, Anexo I).

Portanto, comparando os resultados da Figura 3.21 e Figura 3.22 podemos verificar que para as carnes embaladas com biofilmes incorporados de EHA, houve uma maior inibição do crescimento de microrganismos quando comparados ao controlo e a carne sem filme e que a combinação do extrato de alecrim com o quitosano potencializou a atividade antimicrobiana, devido à presença de fenóis (ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico e rosmanol), que melhoram as propriedades antimicrobianas segundo Georgantelis et al. (2007).

Ao analisar os resultados de coliformes totais na carne (Figura 3.23) nos biofilmes com MMT e sem filme verifica-se que apesar do aumento observado ao fim de 10 dias (com significado, $p<0,05$, Anexo I), quando a amostra controlo é comparada às amostras embaladas nos biofilmes com EHA, verificam-se valores superiores, ou seja, semelhante aos resultados obtidos para os MTV. As carnes envolvidas com biofilmes de quitosano e extrato de alecrim, mostraram mais uma vez que apresentam atividade antimicrobiana potenciada pelo uso do EHA. O efeito da adição de EHA aos filmes é, portanto, significativamente positivo ($p<0,05$, Anexo I).

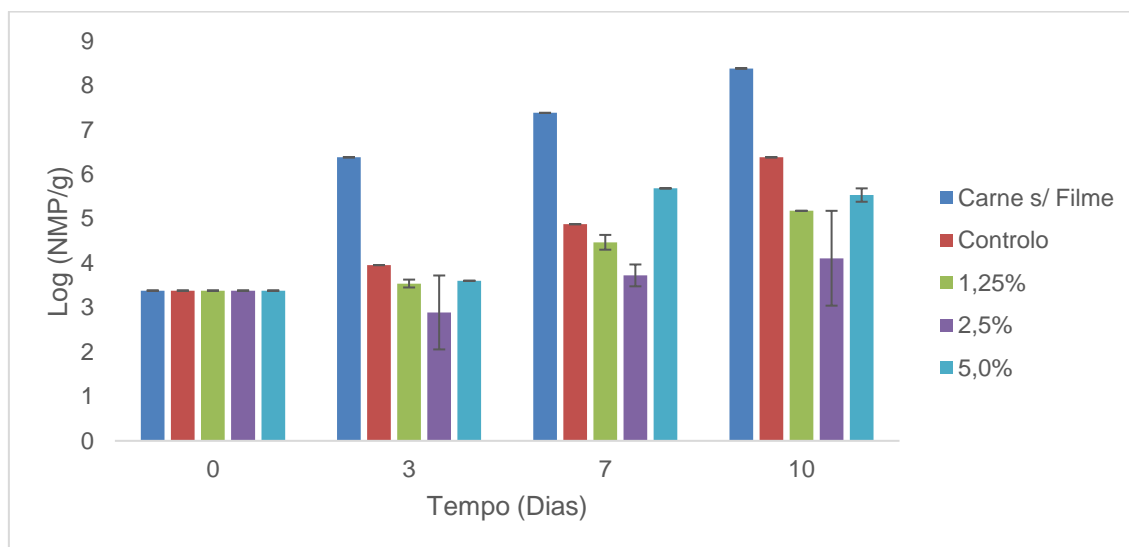


Figura 3.23-Resultados obtidos para a presença de coliformes. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com MMT com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%).

Outro factor verificado nos resultados foi que as amostras embaladas no biofilme com 2,5% de extrato de alecrim apresentou um crescimento de microrganismos menor em relação às outras amostras envolvidas em biofilmes com 1,25% e 5,0% de EHA. De semelhante modo também foi observado nos estudos de Vaquero et al. (2007), através do comportamento para compostos fenólicos do vinho, isso sugere a existência de uma gama de concentrações de compostos para os quais existe inibição maior.

Os filmes com extrato de alecrim têm um papel importante na proliferação de microrganismos. Siripatrawan e Noipha (2012), verificaram que a utilização de filmes incorporados com extrato de chá verde em salsichas de porco, tinham atividade antimicrobiana derivada da presença de polifenóis que inibem a síntese de RNA e DNA em células microbianas, inibem funções da membrana citoplasmática de bactérias e interferem com os metabolismos energéticos das mesmas. Uma vez que no extrato de alecrim também existem polifenóis, isto também acontece. E nestes são encontrados diterpenos fenólicos que são responsáveis pela atividade antimicrobiana geralmente mais efetiva nas bactérias Gram-positivas (Georgantelis et al., 2007).

Ao comparar os resultados de coliformes das amostras de frango envolvidas nos biofilmes com e sem MMT (Figura 3.23 e 3.24), verifica-se que apresentam semelhanças entre si, já que, se verifica um crescimento significativo ao longo de 10 dias e se verificam diferenças na contaminação microbiana devido ao efeito antimicrobiano dos EHA e do quitosano. Ao fim de 10 dias os resultados mostram que a carne embalada em películas com extrato de alecrim e quitosano apresentaram menor crescimento microbiano quando comparados à carne sem filme. O menor crescimento microbiano foi observado nas amostras embaladas nos biofilmes com 2,5% de extrato de alecrim, e no quitosano sem EHA.

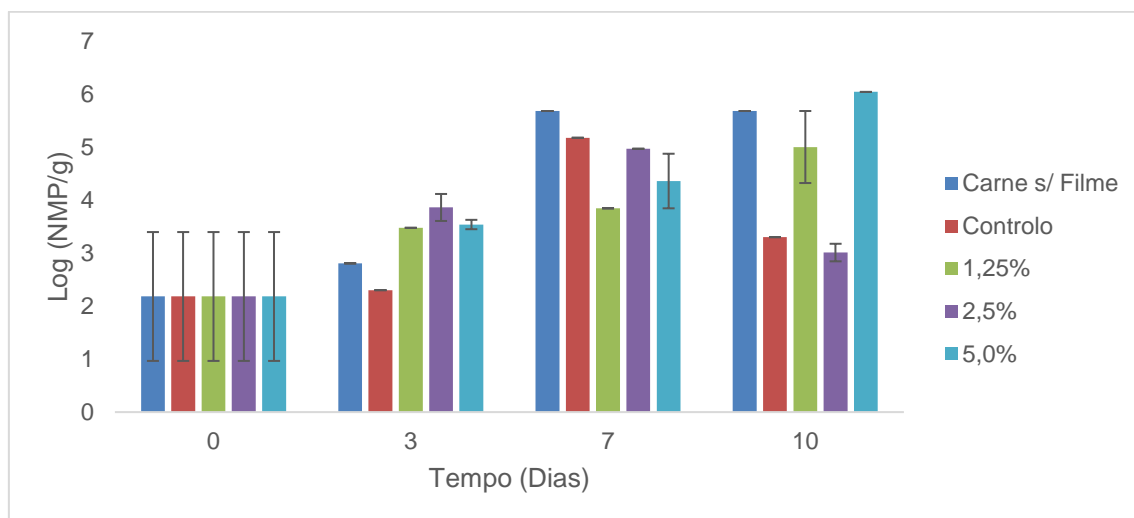


Figura 3.24-Resultados obtidos para a presença de coliformes. Ensaios realizados para carne sem filme e para a carne embalada nos biofilmes incorporados com diferentes concentrações de extrato de alecrim (0%, 1,25%; 2,5%; 5,0%), e sem MMT.

Apesar de se ter obtido diferenças significativas entre os resultados apresentados na Figura 3.23 e 3.24, que indicam uma menor contaminação por coliformes nos biofilmes sem MMT ($p > 0,05$, Anexo I), esta diferença resulta do fato da carne utilizada no ensaio com filmes sem MMT (resultados apresentados na Figura 3.24)

ter tido uma contaminação em coliformes no dia 0 muito reduzida, e não da incorporação ou não incorporação com MMT. Esta diferença entre valores obtidos em amostras de carne no tempo 0 pode ser explicada por uma deficiente manipulação do produto alimentar na distribuição. O mesmo foi observado em estudos realizados por Engel et al. (2016), que observaram que diferentes condições higiênico-sanitárias pode conduzir a diferentes valores de coliformes.

3.2 ANÁLISES DE MIGRAÇÃO

Avaliar a migração ou a libertação de compostos ativos para a matriz polimérica é indispensável. Isso ocorre por meio de ensaios, avaliando-se a difusão para o meio para mimetizar o processo em contacto com alimentos. Além disso, esses ensaios permitem aumentar o conhecimento sobre a atividade das embalagens e como esta pode ser potenciada (López-de-Dicastillo et al., 2012).

Os aditivos adicionados em algumas embalagens de alimentos e outros plásticos são usados geralmente para melhorar as propriedades dos polímeros, os quais, podem libertar substâncias provenientes das paredes da embalagem do produto por fenómenos de natureza físico-química (Canedo 2007).

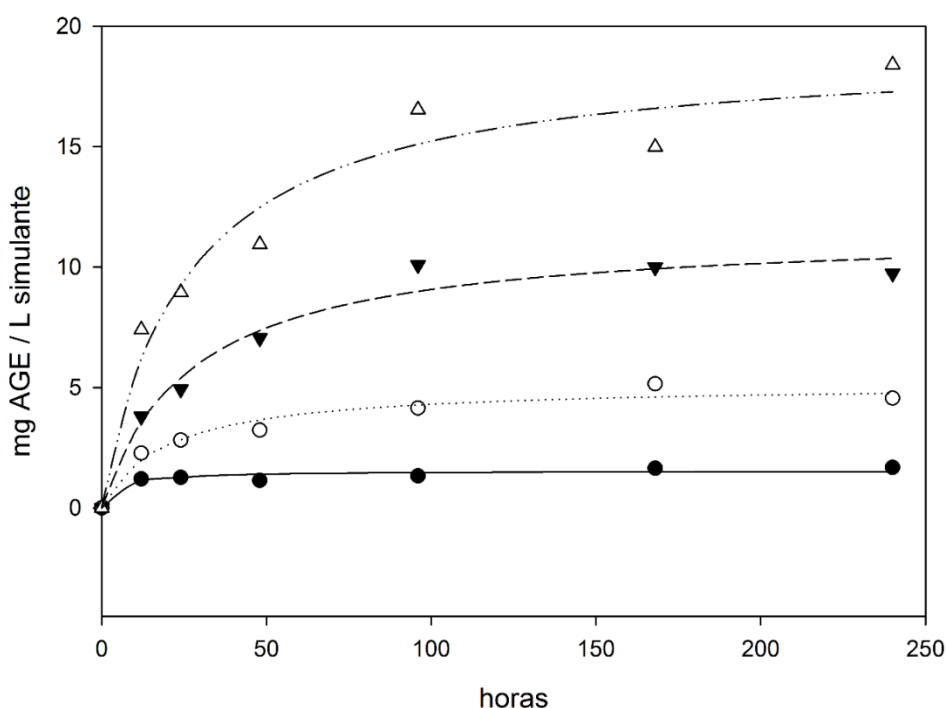


Figura 3.25- Teste de migração de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias, com MMT. Legenda: Controle (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).

Verificou-se que houve migração dos compostos fenólicos para o meio simulante ao longo do tempo, e que quanto maior a concentração de EHA incorporado nos filmes maiores os teores difundidos (Figura 3.25). Carrizo et al. (2014) verificaram que a migração de ácido galico, catequinas e cafeína aumentou com o aumento da concentração de chá verde incorporado, sendo a melhor formulação com 17% (w/w) de chá verde para aplicação de embalagens ativas na indústria de embalagens de alimentos.

O perfil de libertação dos compostos fenólicos segue um comportamento exponencial até um máximo, quando se atinge o equilíbrio (Figura 3.25). Em geral, após os quatro primeiros dias de exposição (96 horas), todos os compostos fenólicos já se encontram difundidos no simulante. Estes resultados corroboram com os encontrados por López-de-Dicastillo et al. (2011) e Suppakul et al. (2012) que avaliaram a migração de compostos fenólicos de filmes de copolímero de etileno e álcool vinílico (EVOH) e polietileno de baixa densidade incorporados com ácido ascórbico, ácido ferúlico, quercetina e extrato de chá verde e linalol e methylchavicol, respectivamente.

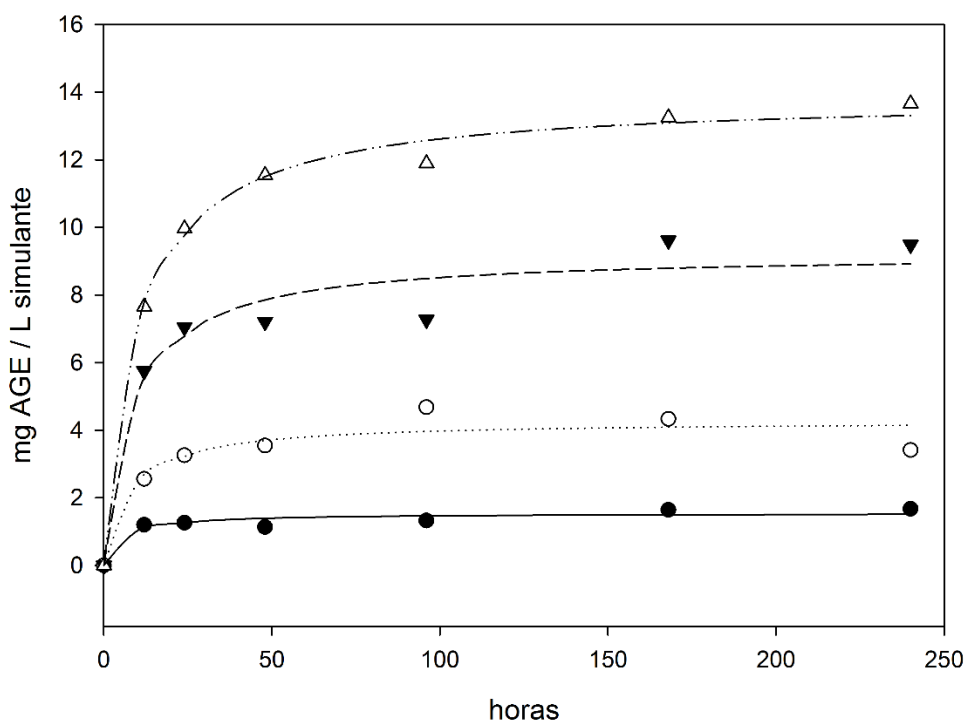


Figura 3.26-Teste de migração de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias.

Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ)

De semelhante modo como se observa (Figura 3.26) o mesmo acontece para os resultados sem MMT, sendo a taxa de migração de nível máximo libertado em filmes incorporados com 5% de extrato alecrim. Entretanto, verifica-se uma taxa de migração maior para os filmes sem incorporação do MMT, ou seja, o equilíbrio foi atingido após

48 horas de ensaio. Desta forma, pode-se sugerir que a interação entre o MMT, o quitosano e os compostos fenólicos favorece uma difusão dos compostos ativos de forma controlada, pois na migração o tempo é superior. López-de-Dicastillo et al. (2011) verificou que a interação química do polímero pode interferir na migração de compostos.

A atividade antioxidante DPPH, mostrou resultados proporcionais à concentração de fenois, o que também foi verificado nos estudos de López-de-Dicastillo et al (2011).

Os resultados mostraram atividade antioxidante elevada (Figura 3.27), a qual foi superior nos filmes com 5% de extrato de alecrim, com (Figura 3.27) e sem MMT (Figura 3.28). O desempenho antioxidante aumenta com o aumento de EHA incorporado.

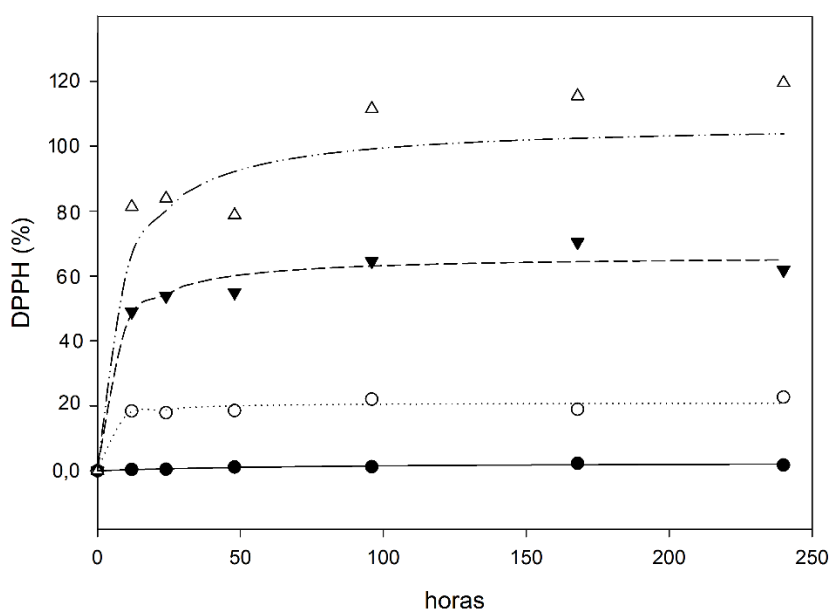


Figura 3.27- Teste de DPPH de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias, com MMT. Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).

Sendo assim, quanto maior a concentração de extrato maior é o valor de actividade antioxidante que migrou para o meio. A atividade antioxidante é mais elevada após 100 horas, tanto para os resultados com MMT (Figura 3.27) como para os resultados sem MMT (Figura 3.28). Entretanto, os resultados com a nanoargila (MMT) apresentaram uma tendência para a migração de compostos com maior atividade antioxidante, ao contrário do que foi verificado para a migração de compostos fenólicos

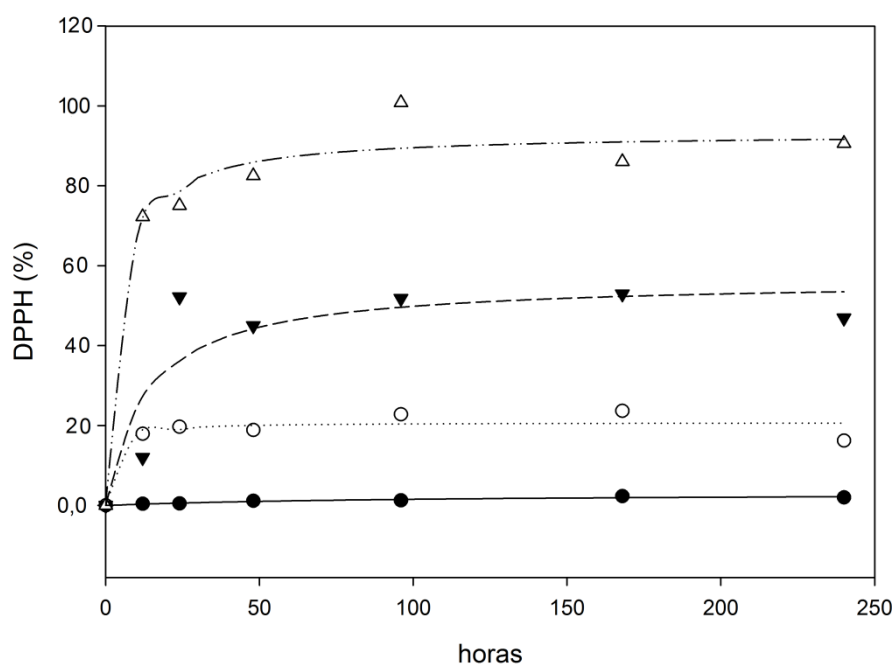


Figura 3.28- Teste de DPPH de biofilmes de quitosano incorporados com EHA ao longo de 10 dias.

Legenda: Controlo (●); 1,25% (○); 2,5% (▼); 5% (Δ).

4 CONCLUSÃO

Portanto pode-se concluir com o trabalho realizado que a incorporação de extrato hidroalcoólico de alecrim aos biofilmes de quitosano melhoram as propriedades antioxidantes e antimicrobianas, devido ao seu alto teor de compostos fenólicos, preservando as carnes de frango durante o seu armazenamento.

Como foi verificado o quitosano também apresentou ação antibacteriana, e a adição do alecrim aumentou o seu potencial de proteção, quer para os microrganismos totais viáveis quer para os coliformes totais. Visto que essa ação corrobora com os resultados obtidos para o pH, que durante a armazenagem das amostras com os extratos de alecrim permitiram um pH estável, diminuindo a possibilidade de criar um ambiente mais propício ao crescimento de microrganismos.

Em relação a humidade como observado os filmes incorporados com EHA permitem uma menor absorção de água ao longo do tempo. Os teores de cinzas apresentaram-se relativamente baixos (considerando a composição mineral da nanoargila), demonstrando que as mesmas não migraram para a carne.

Relativamente ao poder antioxidante os resultados foram pouco conclusivos, dado que existiram muitas oscilações de valores ao longo do tempo para quase todas as amostras no método do TBA, embora se reconheça uma tendência para o aumento da atividade antioxidante com o aumento de EHA no quitosano. A avaliação da cor, nomeadamente o ângulo de Hue demonstrou que os filmes tinham capacidade de manter a cor por mais tempo podendo indicar uma diminuição na oxidação ao longo do tempo relativamente à amostra de carne sem filme.

O teste de migração permitiu avaliar que as embalagens desenvolvidas são capazes de migrar compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. Estes são libertados ao longo do tempo e a maior libertação foi em 5% de EHA. Os resultados com a nanoargila apresentaram uma tendência para migração de mais compostos com atividade antioxidante, ao contrário da migração de compostos fenólicos (que foi mais célere nos filmes sem MMT).

Conclui-se, assim, que a incorporação de extratos é benéfica para a conservação, a nível microbiano da carne. Tendo a vantagem de estes filmes serem biodegradáveis e biocompatíveis. Dentre as concentrações testadas a incorporação de 2,5 % apresentou uma tendência para a menor proliferação de microrganismos e coliformes totais, resultando na melhor conservação do produto, sendo esta uma melhor alternativa para utilização em carne fresca de frango.

Algumas lacunas ainda ficam por ser preenchidas, e sugere-se, desta forma, para trabalhos futuros que seja feita a caracterização dos compostos fenólicos do extrato hidroalcolico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), e identificação dos que migraram. Ainda, comparar os presentes resultados com carnes embaladas em atmosferas modificadas (vácuo) usualmente utilizadas comercialmente. Finalmente, avaliar por meio de provas sensoriais se o sabor e odor das carnes embaladas nos filmes ativos sofrem interferência devido ao contacto com os biofilmes incorporados com os extrato de alecrim, e se o biofilme é aceite pelos consumidores.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., & Rezaei, M., Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Angelo, A. J. St. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(3), 175-224.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in food science & technology*, 48, 51-62.
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Tahzibi, A., Bayati, K. H., Pouladzadeh, M., Zohuriaan-Mehr, M. J., & Rafiee-Tehrani, M. (2004). Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer Journal*, 40(7), 1355-1361.
- Backes, Â. M., Nascimento Terra, N., Guidolin Milani, L. I., de Souza Rezer, A. P., Lüdtke, F. L., Pasqualin Cavaleiro, C., & Martins Fries, L. L. (2013). Características físico-químicas e aceitação sensorial de salame tipo Italiano com adição de óleo de canola. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(2), 3709-3720.
- Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., & Pohlman, F. W. (2006). The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73(3), 413-421.
- Barbut, S. (2009). Pale, soft, and exudative poultry meat—Reviewing ways to manage at the processing plant. *Poultry science*, 88(7), 1506-1512.
- Baston, O., Tofan, I., Stroia, A. L., Moise, D., & Barna, O. (2008). Refrigerated chicken meat freshness. Correlation between easily hydrolysable nitrogen, pH value and biogenic amine contents. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI--Food Technology*, 1(31), 37-43.
- Battisti, R. (2016). Desenvolvimento de folha celulósica com revestimento biodegradável e ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca.
- Bazargani-Gilani, B., Aliakbarlu, J., & Tajik, H. (2015). Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 280-287.
- Bolumar, T., Andersen, M. L., & Orlie, V. (2011). Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 129(4), 1406-1412.
- Borba, H., Scatolini-Silva, A. M., Giampietro-Ganeco, A., Boiago, M., & Souza, P. A. (2012). Características físico-químicas e sensoriais de embutido fresco de aves de descarte preparado com diferentes antioxidantes naturais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 13(2) 360-370.
- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., ... & Krastev, Z. (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well

diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of medical microbiology*, 54(5), 481-483.

Braga, L. R., & Peres, L. (2010). New Trends In Packaging For Foods: A Review [novas Tendências Em Embalagens Para Alimentos: Revisão]. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*.

Campos, C. A., Gerschenson, L. N., Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.

Carrizo, D., Gullo, G., Bosetti, O., & Nerín, C. (2014). Development of an active food packaging system with antioxidant properties based on green tea extract. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 364-373.

Costa, S.A., Pozzani, L.S., Costa, S.M., Rogero, S.O., Cruz, A.S. and A., P. (2008). Fibras Têxteis Híbridas à base de celulose e quitosana para aplicações médicas, 18º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Darmadji, P., & Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat science*, 38(2), 243-254.

Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., ... & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 72, 606-613.

De Azeredo, H. M. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240-1253.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21(6), 703-714.

Dilbaghi, N., & Sharma, S. (2007). Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection. *Food and Industrial Microbiology*.

Durango Villadiego, A. M., Ferreira Soares, N. D. F., de Andrade, N. J., Puschmann, R., Rodrigues Minim, V. P., & Cruz, R. (2005). Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. *Revista Ceres*, 52(300), 221-244.

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.

Espitia, P.J.P.; Soares, N.F.F.; Coimbra, J.S.R.; Andrade, N.J.; Cruz, R.S.; Medeiros, E.A.A. (2012). Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 187-204.

Fai, A. E. C., Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M. (2008). Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista iberoamericana de polímeros*, 9(5), 435-451.

FAO FAO's Animal Production and Health Division: Meat & Meat Products, http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_composition.html

Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345-353.

Fernando, A.L. (2006) Folhas de Apoio à disciplina de Acondicionamento e Embalagem de Alimentos, GDEH, FCT/UNL.

Fernando, A.L., Duarte, M.P., Vatsanidou, A., Alexopoulou, E. (2015) Environmental aspects of fiber crops cultivation and use, *Industrial Crops and Products*, 68, 105–115

Fernando, A.L.A.C. (1996) Valorização da biomassa obtida em lagoas fotossintéticas de alta carga a partir de um efluente de suinicultura. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Alimentar, FCT/UNL, Caparica, Portugal.

Fernando, A.L.A.C. (2015) Análise de alimentos: caracterização físico-química, FCT/UNL, disponível em <http://docentes.fct.unl.pt/ala/publications>.

Ferreira, M. D., & Minami, K. (2000). Qualidade de bulbos de cebola em consequência de tratamentos pré-colheita. *Scientia Agricola*, 57(4), 693-701.

Garrido, M. D., Auqui, M., Martí, N., & Linares, M. B. (2011). Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2238-2243.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 76(1), 172-181.

Glamoclija, N., Starcevic, M., Janjic, J., Ivanovic, J., Boskovic, M., Djordjevic, J., ... & Baltic, M. Z. (2015). The effect of breed line and age on measurements of pH-value as meat quality parameter in breast muscles (m. pectoralis major) of broiler chickens. *Procedia Food Science*, 5, 89-92.

Harder, M. N. C., Canniatti-Brazaca, S. G., & Arthur, V. (2007). Avaliacao quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com urucum (*Bixa orellana*). *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*, 102, 339-342.

Hayashi, Y., Ohara, N., Ganno, T., Ishizaki, H., & Yanagiguchi, K. (2007). Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. *Journal of dentistry*, 35(11), 871-874.

Helmroth, E., Rijk, R., Dekker, M., & Jongen, W. (2002). Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 102-109.

Henrique, C. M., Cereda, M. P., & Sarmento, S. B. S. (2008). Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 231-240.

IAL (Instituto Adolfo Lutz) (2008). Métodos físico-químico para análise de alimentos. coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo p. 1020.

Ibrahim, H., Qiang, H., S. Al-Rekabi, W., & Yain. (2012). Improvements in Biofilm Processes for Wastewater Treatment. 11, 8, 708 – 734.

ISO 4831:2006(en), Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique, <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:4831:ed-3:v1:en>

ISO 4833-1:2013 - Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique, <https://www.iso.org/standard/53728.html>

Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107(2), 845-852.

Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT-Food science and technology*, 53(1), 321-326.

Karpińska-Tymoszczyk, M. (2013). The effect of oil-soluble rosemary extract, sodium erythorbate, their mixture, and packaging method on the quality of Turkey meatballs. *Journal of food science and technology*, 50(3), 443-454.

King, D. A., Shackelford, S. D., & Wheeler, T. L. (2011). Relative contributions of animal and muscle effects to variation in beef lean color stability. *Journal of animal science*, 89(5), 1434-1451.

Leceta, I., Guerrero, P., & De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate polymers*, 93(1), 339-346.

Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., & Xie, B. J. (2006). Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 488-494.

López-de-Dicastillo C, Gómez-Estaca J, Catalá R, Gavara R, Hernández-Muñoz P. (2012) Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chem*, 131,1376–84.

Macedo, V. F., Zanardo, J. G., Lopes, R. P. C., de Mendonça, H. F. M. S., Raymundo, N. L. S., & Moraes, R. (2016). Prevalência de coliformes e staphylococcus aureus em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES. 1) Corpo Editorial 2) Instruções para autores, 2(2), 27-38.

Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., & Nerín, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30(2), 370-378.

Milani, L. I. G., Terra, N. N., Fries, L. L. M., Rezer, A. P. S., Ferreira, S. F., Cichoski, A. J., & Valente, C. R. F. (2010). Oxidação lipídica, características sensoriais e cor da carne de frango adicionada de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) e submetida a tratamento térmico. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 13(4), 242-250.

Mohamed, H. M., & Mansour, H. A. (2012). Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. *LWT-Food Science and Technology*, 45(1), 79-87.

Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria*

multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.

Nascimento, S. D., de Oliveira, T. A., dos Santos, F. K. G., de Lima Leite, R. H., & Aroucha, E. M. M. (2013). Efeito da adição de argila nas propriedades de biofilme de quitosana. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8(1), 306-312.

Oliveira, L., Oliveira, P., (2004). Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. *Brazilian Journal of food technology*, 7, 2, 161-165.

Osawa, C. C., Felicio, P. E. D., & Gonçalves, L. A. G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova.*, 28 (4), 655

Ozkececi, R. B., Karakaya, M., Yilmaz, M. T., Saricoban, C., & Ockerman, H. W. (2008). The effect of carcass part and packaging method on the storage stability of mechanically deboned chicken meat. *Journal of muscle foods*, 19(3), 288-301.

Pascoal, A., Quirantes-Piné, R., Fernando, A.L., Alexopoulou, E., Segura-Carretero, A. (2015), Phenolic composition and antioxidant activity of kenaf leaves, *Industrial Crops and Products*, 78, 116–123. (doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.028)

Pereda, M., Aranguren, M. I., & Marcovich, N. E. (2008). Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 1080-1090.

Pereira, L. K., de Abreu, A. F., Bolzan, A. (2002). A necessidade de inovar: um estudo na indústria de alimentos. *Revista de Ciências da Administração*, 4(7), 19.

Portes, E., Gardrat, C., Castellan, A., Coma, V. (2009). Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 578-584.

Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M., (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT – Food Science and Technology* 38 (8), 859–865.

Qiao, M., Fletcher, D. L., Smith, D. P., & Northcutt, J. K. (2001). The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. *Poultry Science*, 80(5), 676-680.

Quintavalla, S., Vicini, L., (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62 (3), 373–380.

Rahmawati, P., Ni'maturrohman, D., Sari, P. L., Sari, P. P., Sari, T. N. I., Suryanti, V. (2016). Preparation and properties of arenga starch-chitosan based edible film. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 107, No. 1, p. 012047). IOP Publishing.

Sagoo, S., Board, R., & Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19(2-3), 175-182.

Schinella G. R.; Troiani, G.; Davila, V.; Buschiazzi, P. M.; Tournier, H. A (2000). Antioxidant effects an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Biophys. Res.*, 269, 2, 57-360.

Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., Plata-Oviedo, M., & Montes-Villanueva, N. D. (2011). Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat science*, 88(3), 397-403.

- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, 10(2), 37-51.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102-108
- Soares, N., Silva, W., Pires, A., Camilloto, G., Silva, P., (2009). Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, 56(4), 370- 378.
- Soriano-Santos, J. (2010). Chemical composition and nutritional content of raw poultry meat. 2010) *Handbook of Poultry Science and Technology*, 1, 467-491.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G.; Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 84-95.
- Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 63-70.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 107, 565-572.
- Srinivasa, P. C., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan—Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Reviews International*, 23(1), 53-72.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food hydrocolloids*, 21(7), 1113-1122.
- Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2011). Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1888-1893.
- Teruel, M. R., Garrido, M. D., Espinosa, M. C., & Linares, M. B. (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food chemistry*, 172, 40-46.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
- Vaquero, M. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18(2), 93-101.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547.
- Venturini, K. S., Sarcinelli, M. F., & Silva, L. C. (2007). Características da carne de frango. *Boletim Técnico-PIE-UFES*.
- Véronique, C. O. M. A. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat science*, 78(1), 90-103.
- Vieira, I. M., Sousa, M. S. B., Mancini-filho, J., & Lima, A. D. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 1-10.

Wada, M., Nagano, M., Kido, H., Ikeda, R., Kuroda, N., & Nakashima, K. (2011). Suitability of TBA method for the evaluation of the oxidative effect of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts. *Journal of oleo science*, 60(11), 579-584.

Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(7), 45-51.

ANEXO I

As análises de variância para os parâmetros avaliados podem ser encontrados nas Tabelas A.1. Devido ao volume dos dados e variáveis, optou-se por realizar uma abordagem qualitativa dos resultados estatísticos.

Tabela A.1- Resultados obtidos na realização do teste ANOVA 3 entradas, aos parâmetros analisados na carne, avaliando-se o efeito dos extratos de alecrim nos filmes, o efeito da inclusão de argila, e o efeito do tempo de armazenagem.

	<i>EHA</i>	<i>Argila</i> (A)	<i>Tempo</i> (T)	<i>EHA*A*T</i>	<i>EHA*A</i>	<i>EHA*T</i>	<i>A*T</i>
<i>L</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(ns)
<i>a*</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(ns)	(ns)	(+++)	(ns)
<i>b*</i>	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(ns)
ΔE	(+++)	(ns)	(+++)	(ns)	(++)	(+++)	(ns)
<i>Ângulo de Hue</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(ns)
<i>pH</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(+++)	(ns)	(+++)	(++)
<i>Acidez</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(++)	(ns)	(+++)	(+++)
<i>Humidade</i>	(+++)	(ns)	(+)	(ns)	(ns)	(+)	(ns)
<i>Cinzas</i>	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
<i>TBARS</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(ns)	(ns)	(++)	(++)
<i>Coliformes</i>	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(ns)
<i>Totais</i>							
<i>Microorganismos</i>	(+++)	(ns)	(+++)	(++)	(ns)	(+++)	(ns)
<i>Totais Viáveis</i>							

*ns (não significativo, $p>0,05$); +++ ($p<0,001$); ++ ($p<0,01$); + ($p<0,05$).